
ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

ÉTUDE DE LA RÉACTION AGGLUTINANTE DU SÉRUM

DANS LES

Infections expérimentales et humaines à pneumocoques.

PAR MM. F. BEZANÇON ET V. GRIFFON

Au cours des infections pneumococciques, le sérum de l'homme et des animaux acquiert la propriété d'agglutiner le pneumocoque¹.

Comme nous l'avons vu, avec M. Widal, dans une première série de recherches², le phénomène ne peut être mis en évidence par le *procédé de Widal* pour le sérodiagnostic de la fièvre typhoïde : le pouvoir agglutinatif n'atteint pas, en effet, dans le sérum des malades infectés par le pneumocoque, un degré suffisant pour qu'on puisse le déceler dans le sérum dilué par addition de bouillon. La réaction devient par contre très nette si l'on recourt à une technique différente : *culture du pneumocoque dans le sérum non dilué*.

Nous avons été conduits à l'emploi de cette technique par nos recherches antérieures sur le mode de développement du pneumocoque dans les divers sérums normaux et pathologiques³. Cette étude nous avait montré que le pneumocoque se développe facilement dans le sérum normal de l'homme et des animaux de laboratoire, et qu'il s'y présente sous l'aspect de diplocoques encapsulés non réunis en chaînettes ou en amas.

1. BEZANÇON et GRIFFON. *Société de Biologie*, 5 juin 1897; *Presse Médicale*, 17 juillet 1897, page 25; *Congrès Français de Méd. int.*, Montpellier, 1898.

2. BEZANÇON et GRIFFON. *Congrès français de Méd. int.*, Nancy, 6 août 1896.

3. F. BEZANÇON et GRIFFON. *Société de Biologie*, 19 février 1898.

Nous n'avions donc point à craindre, en recourant à la culture directe en sérum, l'inconvénient qui a amené M. Bordet¹ à préconiser l'emploi de sérums dilués pour la recherche du phénomène de l'agglutination, l'agglutination possible de certains microbes, du bacille d'Éberth et du vibrion cholérique en particulier, par le sérum normal.

Nous nous rappelions d'autre part que M. Metchnikoff² avait montré en 1891, à une époque où il n'était pas encore question du phénomène de l'agglutination, que le microbe de la pneumonie forme dans le sérum des lapins vaccinés des paquets de streptocoques très longs, et qu'il peut même se produire un dépôt au fond et sur les parois du tube de culture (Mosny³).

C'est cette technique de la culture du microbe en sérum non dilué qui nous a permis d'appliquer aux infections à pneumocoque la méthode du sérodiagnostic de Widal, et de vérifier si la réaction agglutinante est bien, dans les infections pneumococciques, comme l'a montré Widal pour l'infection éberthienne, non pas seulement une réaction d'immunité, mais bien une réaction apparaissant déjà au cours de la période d'infection.

Cette technique de la séro-réaction pneumococcique étant différente de la technique usuelle, nous la décrirons en détail.

Pour les recherches expérimentales, le sérum est recueilli par les procédés ordinaires, par la saignée carotidienne chez le lapin, fémorale chez le chien. Pour les recherches cliniques, la piqûre du doigt ne donne pas une assez grande quantité de sang; il faut recourir à la prise aseptique du sang, dans l'une des veines superficielles du coude, au moyen d'une aiguille enfoncée directement dans la veine et adaptée, au niveau de son pavillon, à un petit tube en caoutchouc.

Cette dernière technique, que nous avons employée au début pour nos recherches de contrôle, et qu'on ne peut évidemment pas faire entrer dans la pratique journalière, n'est pas indispensable pour l'étude de la séroréaction pneumococcique. Il n'est pas, en effet, nécessaire d'avoir à sa disposition un sérum rigoureusement aseptique; les germes saprophytes de la peau ne se développent que très lentement dans le sérum humain: il suffit

1. BORDET. Ces *Annales*, 1895, p. 492.

2. METCHNIKOFF. Ces *Annales*, 1891, p. 371.

3. MOSNY. *Archives de Médecine exp.*, 1892, page 288.

d'utiliser le sang fourni par l'application d'une à deux ventouses scarifiées. La peau est soigneusement nettoyée d'abord au savon, puis lavée à l'éther; les ventouses sont préalablement stérilisées au four à flamber. Le sang une fois recueilli, il vaut mieux le transvaser de suite dans un verre à expérience stérilisé et recouvert de papier; attendre la coagulation, puis la transsudation du sérum, et répartir alors en tubes à essai.

La quantité de sérum nécessaire pour la technique est de 1 à 2 c. c. environ. Le sérum ne doit pas être imprégné d'hémoglobine. Les tubes sont alors ensemencés avec une trace de culture de pneumocoque¹ et portés à l'étuve à 37° pendant 15 à 16 heures.

Au bout de ce temps, la culture doit être examinée à la fois à l'œil nu et au microscope. S'il s'agit de sérum de lapin normal, le milieu est trouble, sans dépôt, et l'examen microscopique y montre la présence d'innombrables pneumocoques encapsulés, nettement séparés les uns des autres et non groupés en amas; s'il s'agit de sérum humain normal, le sérum se trouble à peine, et si l'on prélève une goutte pour l'examiner au microscope, on y voit des diplocoques répartis uniformément dans le champ de la préparation, encapsulés, quelquefois groupés bout à bout, de façon à constituer une très courte chaînette de 3 à 4 grains.

Dans le cas d'infection pneumococcique, la culture peut se présenter sous deux aspects principaux : ou bien le sérum est demeuré clair, et l'on voit au fond du tube un précipité très net (*agglutination macroscopique*); ou bien le milieu est uniformément trouble, et le microscope est nécessaire pour déceler l'agglutination (*agglutination microscopique*).

1. La conservation de cultures vivantes de pneumocoque a passé longtemps pour très difficile, étant donné le peu de longévité de ce microbe, dans les milieux de culture usuels.

Il est cependant facile de conserver très longtemps le pneumocoque vivant en l'ensemencant dans le sang défibriné, additionné de sérosité d'ascite. Dans ce milieu, le microbe peut rester vivant pendant une année.

Dans le sang dilué comme dans les milieux contenant de l'hémoglobine, le pneumocoque se développe très souvent en chaînettes; repiqué sur gélose ou sur bouillon, le microbe conserve héréditairement cette propriété de se mettre en chaînettes. Il la perd par contre, si on l'ensemence dans le sérum de jeune lapin où il reprend sa forme typique de diplocoque encapsulé.

On n'ensemencera donc jamais directement le pneumocoque venant de sang dilué dans le sérum suspect; il faut toujours le faire passer auparavant, pour lui, rendre sa forme normale, dans le sérum de lapin.

1^o *Agglutination macroscopique.* — Le précipité, visible à l'œil nu, peut être moulé sur l'extrémité inférieure du tube, ou bien se présente sous forme de fragments pseudo-membraneux multiples, aplatis, rubannés; de flocons irréguliers; de grains très fins, véritable poussière qui monte en suspension dans le sérum dès qu'on agite le tube : telles sont, rangées par ordre d'intensité décroissante, les réactions que l'on peut observer.

L'agitation ne suffit généralement pas pour amener la dislocation du précipité; il se reforme par le repos. Cependant, dans quelques cas, la désaggrégation presque complète est possible, et, momentanément du moins, l'agglutination ne se reconnaît plus que si l'on vient à pratiquer l'examen microscopique.

2^o *Agglutination microscopique.* — Le séjour à l'étuve fait perdre au sérum sa limpidité primitive; l'aspect trouble peut être plus ou moins accentué. Au microscope, on peut voir : des amas, des chaînettes ou un mélange d'amas et de chaînettes. Ces amas eux-mêmes peuvent être formés de diplocoques intimement accolés ou de chaînettes flexueuses entrelacées.

De la périphérie des amas, on voit fréquemment se détacher des chaînettes qui s'enroulent, forment, par leur ensemble, à l'ilot dont elles émanent, une sorte de collerette et lui donnent l'aspect dit en *tête de Méduse*.

En suivant jour par jour l'apparition et l'évolution de l'agglutination pneumococcique, dans un cas clinique favorable, on peut saisir les différents aspects sous lesquels se manifeste le phénomène dans sa marche ascendante, et reconnaître tous les temps de la gradation que nous venons d'indiquer : chaînettes flexueuses entourées d'abondants diplocoques libres; chaînettes isolées, séparées les unes des autres par des espaces vides; chaînettes beaucoup plus longues, enlacées, enroulées sur elles-mêmes; chaînettes tellement pelotonnées qu'elles constituent de véritables amas.

Puis le phénomène s'accroît; les amas prennent de telles proportions qu'ils deviennent visibles à l'œil nu, en suspension dans le sérum ou précipités au fond du tube, et, si la force agglutinante est suffisante, ils se fondent en une masse unique,

1. Toutes choses égales, la culture en sérum est beaucoup plus riche en pneumocoques dans le cas d'infection pneumococcique que dans un cas témoin.

en un coagulum qui se moule sur le tube qui le reçoit et prend par suite l'aspect d'une cupule.

La constatation inverse peut être faite aisément si au lieu d'étudier une infection pneumococciques à sa période de début on la suit un certain temps pendant la convalescence. On voit alors le pouvoir agglutinant décroître, les fausses membranes se dissoudre en amas microscopiques, l'amas faire place à la chaînette et finalement la chaînette se résoudre en diplocoque.

Pour la netteté des préparations microscopiques, il est bon de ne pas se contenter de déposer une goutte de culture sur une lame et de la recouvrir d'une lamelle, comme lorsqu'il s'agit d'un sérodiagnostic de fièvre typhoïde, où l'appréciation de la mobilité du microbe entre en ligne de compte, et où, d'autre part, la réaction se continuant entre la lame et la lamelle ne doit pas être arrêtée par l'action de la solution colorante. Il en est autrement avec le pneumocoque. Le phénomène est achevé lorsqu'on a recours au microscope; il peut être déjà très net, macroscopique, au bout de 7 heures, et il est bien rare qu'on fasse l'examen avant 24 heures. On peut donc étaler, sécher et colorer la goutte de culture prélevée dans le tube à réaction : la mise au point est plus facile et les détails microscopiques plus apparents.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

A différentes reprises, nous avons nous-mêmes étudié, au point de vue de l'agglutination, le sérum des animaux vaccinés contre le pneumocoque. Nous avons toujours facilement constaté l'existence de cette propriété : si l'on ensemence avec du pneumocoque un tube de sérum de lapin vacciné, on voit, après un séjour de vingt-quatre heures à l'étuve, que bien loin de se troubler comme le fait le sérum de lapin sain ensemencé avec le pneumocoque, le milieu de culture reste limpide, et qu'il se fait au fond du tube un léger dépôt, formé de longues chaînettes de pneumocoques non capsulés, chaînettes qui sont tantôt isolées, tantôt enchevêtrées en amas. On ne voit pas de diplocoques dans les grands vides que laissent entre eux les amas.

Pour nous approcher le plus possible des conditions de la clinique humaine, nous avons cherché à produire, chez les

animaux, des affections lentes non généralisées, permettant la survie. Nous y sommes parvenus en modifiant le degré de réceptivité du lapin, en augmentant la résistance de son organisme vis-à-vis du pneumocoque, en le vaccinant incomplètement par l'injection de culture à virulence atténuée, ou d'exsudation stérilisée par le séjour à 55°, etc : inoculation qui fait ainsi de son organisme, primitivement très sensible au pneumocoque, un terrain relativement réfractaire.

L'immunité ainsi obtenue n'est pas solide, elle n'est que partielle. Si l'on injecte ultérieurement une dose considérable de pneumocoques, mortelle pour les animaux témoins, le lapin ne succombe pas à la septicémie, il peut même être complètement indifférent à cette épreuve ; il n'est pas rare, cependant, qu'il présente des lésions cutanées, viscérales ou articulaires ¹, qui rappellent les infections localisées de la clinique humaine. C'est le sérum de ces animaux sacrifiés en pleine période d'état de l'infection que nous avons étudié au point de vue de l'agglutination.

Le sérum des animaux infectés expérimentalement par le pneumocoque, ensemencé dans les conditions que nous venons d'indiquer, et mis à l'étuve le temps nécessaire, non seulement ne se trouble pas, comme fait le sérum d'un lapin neuf, non seulement possède la propriété agglutinative déjà observée par nous chez les animaux vaccinés, mais il la présente à un degré beaucoup plus élevé. L'intensité du phénomène est telle que tous les pneumocoques sont comme précipités au fond du tube et forment par leur cohésion une véritable cupule couenneuse, qui ne se dissocie pas par agitation du tube. Au-dessus, le sérum demeure clair ; le microscope n'y décèle pas de pneumocoques en suspension. La dilacération du coagulum et l'examen microscopique, après coloration, montrent qu'il est constitué par des amas compacts de diplocoques ou de chaînettes. Un autre caractère qui apparaît très nettement si l'on a coloré la préparation à l'aide du bleu phéniqué Kuhne, c'est la disparition de la netteté des capsules autour des pneumocoques agglutinés. Le contraste est surtout frappant si l'on examine comparativement des pneumocoques cultivés en sérum

1. BEZANÇON ET GRIFFON. *Arch. de méd. expér et d'anat. pathologique*. Novembre 1899.

de lapin sain, pneumocoques dont les capsules prennent une teinte mauve qui les rend très apparentes.

Les lapins sur lesquels ont porté nos recherches ne présentaient pas tous un sérum doué au même degré de la propriété d'agglomérer le pneumocoque.

Chez une partie d'entre eux, la culture en sérum donnait non un coagulum unique, mais plusieurs fragments pseudo-membraneux : à un degré moindre c'étaient des flocons, parfois si fins, qu'ils constituaient une véritable poussière. Chez d'autres le sérum, au lieu de demeurer clair, se troublait, et alors, au microscope, au lieu de voir des amas séparés par des espaces vides, on constatait entre ces amas des diplocoques disséminés ou des chaînettes libres. Ces différents aspects représentent des degrés de l'intensité du pouvoir agglutinatif.

Dans les cas de pouvoir agglutinatif maximum, nous avons pu même aller plus loin, et essayer la méthode des dilutions qui est d'une application courante en matière de bacille d'Eberth. Or, le sérum d'un de nos lapins (lapin Y), dilué dans la proportion d'une goutte de sérum pour 50 gouttes de bouillon, ensemencé, mis à l'étuve et examiné au bout de 24 heures, nous a ainsi donné une agglutination non douteuse, à l'œil nu comme au microscope. Mais le fait est exceptionnel et trop inconstant pour que le procédé des dilutions soit systématiquement appliqué, même dans les infections expérimentales, à la recherche de l'agglutination pneumococcique.

Dans ce cas où la propriété agglutinante pouvait être mise en évidence dans un sérum dilué, la proportion du mélange devait demeurer faible; l'agglutination disparaissait quand la dilution atteignait le chiffre de 1 pour 75; on est donc ici bien loin des chiffres de dilution couramment constatés dans la fièvre typhoïde, 1 pour 200, 1 pour 1,000, 1 pour 5,000, et même au delà!

Atténuation et disparition du phénomène. — Si, dans le cours des expériences, au lieu de sacrifier les lapins lorsque les lésions pneumococciques sont encore en pleine évolution aiguë, on laisse celles-ci passer à l'état chronique ou se réparer, le sérum des animaux perd peu à peu sa force agglutinative, et la réaction, un moment visible à l'œil nu, n'est plus bientôt décelable que par l'examen microscopique.

Bien plus, il nous est arrivé maintes fois d'étudier le sérum de lapins qui, plusieurs mois auparavant, avaient été soumis, à une ou à plusieurs reprises, à l'infection pneumococcique, et de n'y plus trouver que peu ou pas de traces de pouvoir agglomérant. L'agglutination pneumococcique finit donc par disparaître chez le lapin au bout d'un temps relativement court; cette notion est à rapprocher de ce que nous avons observé en matière de vaccination antipneumococcique: l'immunité du lapin contre le pneumocoque, si elle n'est pas entretenue par des inoculations répétées, est toujours éphémère.

RECHERCHES CLINIQUES

Nous avons pratiqué la recherche de la séroréaction pneumococcique chez 186 individus, dont 64 atteints de lésions variées dues au pneumocoque, 22 chez lesquels le rôle pathogène du pneumocoque n'était d'abord pas évident, 100 sujets sains ou souffrant d'affections non pneumococciques; ces derniers constituant des cas témoins.

La fréquence de la pneumonie, la régularité de son évolution, le contrôle qu'apportent à son diagnostic les simples données de la clinique faisaient de cette affection la maladie de choix pour l'étude primordiale de la séroréaction pneumococcique.

Nos recherches ont porté sur 39 cas de pneumonie lobaire primitive et sur 6 cas de pneumonie secondaire.

Dans tous ces cas nous avons constaté l'apparition de la réaction agglutinante au cours de la maladie. L'époque d'apparition du phénomène est un peu variable; la réaction peut parfois être déjà esquissée le 3^e ou 4^e jour de la maladie, exceptionnellement elle est déjà très accentuée à cette période. En général elle n'est bien marquée que la veille de la défervescence, et son maximum coïncide très souvent avec la fin des phénomènes critiques, quelquefois seulement avec le premier jour de la convalescence.

L'intensité du phénomène va croissant jusqu'à l'époque de la défervescence: d'abord purement microscopique, la réaction

devient bientôt visible à l'œil nu, les pneumocoques s'agglutinent sous la forme de grumeaux, puis de fragments pseudo-membraneux, et enfin d'une véritable cupule.

Dans la convalescence de la pneumonie, on peut de bonne heure assister à la diminution graduelle du pouvoir agglutinant du sérum. Nos observations nous ont montré, souvent, la disparition précoce de cette propriété qui diminue déjà au bout d'une semaine, mais peut persister cependant un mois, cinq semaines, peut être même davantage.

La séroréaction pneumococcique, relativement si éphémère, ne pourrait donc permettre, comme la réaction de Widal, un diagnostic rétrospectif à longue échéance.

La réaction agglutinante existe aussi dans les phénomènes secondaires à la grippe, à la fièvre typhoïde; dans ce dernier cas, on peut trouver simultanément la réaction de Widal et la réaction pneumococcique. Ce pouvoir agglutinatif est en général très intense. C'est là une confirmation des expériences entreprises par MM. Widal, Sicard et Nobécourt, sur l'agglutination dans les infections disparates se superposant chez le même individu : chacune d'elles impressionne les humeurs de l'organisme pour son propre compte ¹.

Dans les broncho-pneumonies à pneumocoque, les lésions pneumococciques sans pneumonie, pleurésie purulente, endocardite, etc., la réaction pneumococcique a toujours été positive.

La réaction fut également positive dans un cas d'arthrite purulente à pneumocoque examiné par M. Widal ² en collaboration avec M. Lesné; le sérum donnait, dans ce cas, une agglutination macroscopique.

La réaction agglutinante n'a manqué que dans 6 cas, d'ailleurs de même ordre; il ne s'agissait plus de lésions pneumococciques localisées, mais de cas dans lesquels le pneumocoque avait déterminé une infection sanguine généralisée, mortelle.

Nous avons enfin constaté la présence du pouvoir agglutinant dans le sang de malades atteints d'affections dont la nature pneumococcique, déjà soupçonnée, n'est cependant pas encore établie d'une façon certaine par la clinique et les recherches

1. WIDAL. Les associations microbiennes et les infections mixtes. *Cong. de méd. de Montpellier*, 13 avril 1898.

2. WIDAL et LESNÉ. *Société médicale des hôpitaux*, 6 mai 1898.

bactériologiques. Il s'agit de malades atteints d'angine aiguë non diphtérique (9 cas); de grippe (4 cas); de purpura (2 cas); de granulie (3 cas); de tuberculose pulmonaire chronique avec fièvre hectique.

La présence d'une réaction agglutinante vis-à-vis du pneumocoque dans ces diverses maladies n'est pas pour nous étonner: on sait la fréquence des infections secondaires pneumococciques, dans la grippe et dans la tuberculose: le pneumocoque a pu être constaté directement dans le sang des individus atteints de purpura.

Dans les angines enfin, cette constatation vient à l'appui de l'opinion soutenue déjà par l'un de nous avec M. Widal¹, de la réserve avec laquelle doit être porté le diagnostic d'angine à streptocoque, puisque, même dans les cas où le streptocoque pullule et prédomine dans les tubes de culture de l'exsudat amygdalien, la séroréaction agglutinante décèle la participation du pneumocoque au processus pathologique. La présence du pneumocoque à la surface de l'amygdale, aussi constante, comme nous l'avons établi ailleurs, que celle du streptocoque, rend aisément compte de l'entrée en scène du pneumocoque.

A des degrés différents, avec des prédominances (streptocoque, pneumocoque, etc.), toute angine aiguë est une infection polymicrobienne.

Tandis que dans la fièvre typhoïde on peut, comme l'ont montré MM. Widal et Sicard, rechercher la réaction agglutinante avec un échantillon quelconque de bacille d'Eberth (puisque 26 échantillons étudiés par eux se sont trouvés agglutinés à un taux sensiblement analogue par le même sérum de typhique) dans les infections à pneumocoque, au contraire, la réaction agglutinante semblerait parfois faire défaut si l'on se contentait de la rechercher vis-à-vis d'un échantillon quelconque de pneumocoque.

Comme nous l'avons observé plusieurs fois, un sérum de pneumocoques qui n'agglutinait pas l'échantillon de pneumocoque que nous entretenons dans notre laboratoire, et qui a servi à nos expériences, (pneumocoque retiré il y a trois ans des crachats d'un pneumonique), agglomérerait par contre le pneumo-

1. WIDAL et BESANÇON. Nécessité d'une revision des angines dites à streptocoques. *Société médicale des hôpitaux*, 13 mars 1896.

coque que nous avons isolé de la bouche du malade auquel était fait le prélèvement de sérum ¹.

1. Le tableau ci-joint montre les variations du pouvoir agglutinatif, selon que le sérum est ensemencé avec le pneumocoque, retiré de la lésion, ou de la bouche du malade, ou avec le pneumocoque du laboratoire, ou un échantillon quelconque: l'agglutination macroscopique en cupule est représentée par la lettre M, l'agglutination microscopique par la lettre m. Lorsque l'agglutination a été étudiée à plusieurs reprises, le fait est indiqué.

PNEUMONIES	PNEUMOCOQUE DU MALADE	PNEUMOCOQUE DU LABORATOIRE	AUTRE PNEUMOCOQUE
Observ. 1.....	M	m	—
2.....	—	M	m
3.....	M	m, puis M	—
4.....	M	négatif, puis M	négatif
5.....	—	M	m
	M	m	
6.....	M	M	
	M	m	
7.....	—	M	négatif
8.....	M	m	négatif
9.....	M	négatif	
	m	négatif	
10.....	M	m	
	M	M	
11.....	M	négatif	
12.....	m, puis M	négatif, négatif.	
	négatif	négatif	
13.....	M	m	
	négatif	négatif	
	m	m	
14.....	M	m	
	M	M	
	M	négatif	
15.....	M	M	
16.....	M	m	
17.....	M	négatif	
18.....	m	négatif	négatif
19. (Pn. secondaire).....	M	négatif	m
20. id.	m	négatif	
21. id.	M	M	M ¹
22. (Pleurésie purul.).....	M	négatif	
23. (Spléno-pneumonie)...	M	négatif	négatif
24. (Granulie).....	M	négatif	négatif

1. Ce sérum a été ensemencé avec 3 autres échantillons de pneumocoque; avec les 2 premiers, agglutination microscopique; avec le 3^e, pas d'agglutination.

Ces cas où le sérum des pneumoniques n'agglutine pas un échantillon quelconque de pneumocoque ont été relativement rares. Le plus souvent le même sérum agglutinait à la fois le pneumocoque du laboratoire et l'échantillon de pneumocoque que nous retirions de la bouche du malade ; mais la réaction présentait dans ces deux cas des degrés différents : l'agglutination étant toujours plus intense avec le pneumocoque de la gorge du malade qu'avec celui du laboratoire. Ainsi quand la réaction n'était qu'esquissée avec le pneumocoque du malade, elle manquait totalement avec le pneumocoque du laboratoire ; quand, l'intensité du pouvoir agglutinatif augmentant graduellement avec l'évolution de la maladie, on obtenait un résultat macroscopique avec le pneumocoque de la gorge du malade, la réaction n'était encore visible qu'au microscope avec le pneumocoque du laboratoire, et c'est seulement lorsque le pouvoir agglomérant atteignait son degré maximum, que les deux échantillons pneumococciques étaient tous les deux agglutinés à l'œil nu d'une façon sensiblement égale. Ainsi, lorsque le sérum est doué d'un pouvoir agglutinatif très intense, il impressionne presque tous les échantillons de pneumocoque qu'on met à son contact : le sérum d'un de nos malades agglutinait cinq échantillons différents de pneumocoque, il n'agglutinait pas cependant un sixième échantillon qui était facilement agglutiné par contre par le sérum même du malade chez qui il avait été prélevé.

Inversement, lors de la décroissance progressive de l'intensité de la réaction, c'est le pneumocoque de la gorge du malade qui conserve le dernier la faculté d'être agglutiné.

Le fait que le sérum des individus infectés par le pneumocoque agglutine toujours davantage et quelquefois même exclusivement l'échantillon de pneumocoque qui se trouve dans la bouche du malade, cadre bien avec notre conception actuelle de la pneumonie, maladie autochtone dans le plus grand nombre des cas, ne relevant pas d'une infection venue de l'extérieur, mais reconnaissant pour cause la migration descendante d'un parasite permanent de notre organisme, le pneumocoque salivaire, saprophyte constant¹ de notre cavité bucco-pharyngée.

Cette notion de la pluralité des échantillons pneumococci-

1. BEZANÇON et GRIFFON. Présence constante du pneumocoque à la surface de l'amygdale. (*Société Médicale des Hôpitaux*, 13 avril 1898).

ques décelée par l'agglutination, et d'autre part ce fait que le sérum des malades agglutine toujours davantage l'échantillon même de pneumocoque qui a déterminé la maladie, nous amènent à discuter la valeur de la réaction agglutinante pour la classification des espèces microbiennes.



Les résultats fournis par la séroréaction agglutinante pour le diagnostic différentiel des microbes ont une valeur inégale suivant la nature de l'espèce microbienne expérimentée. Tandis que, pour le bacille d'Eberth, cette méthode est absolument rigoureuse, puisque, comme l'ont vu MM. Widal et Suard, tous les échantillons de bacille d'Eberth sont impressionnés d'une façon sensiblement égale par un même sérum agglutinant, il n'en est déjà plus tout à fait de même pour le vibron cholérique. Les divers échantillons de ce microbe ne se comportent pas tous de la même façon vis-à-vis de l'agglutination. Si un sérum d'animal vacciné contre le vibron indien agglutine bien aussi les autres vibrions cholérigènes, il est sans action sur le vibron de Massouah ; d'autre part, MM. Widal et Nobécourt ont montré qu'un même sérum, possédant un pouvoir agglutinatif à peu près identique pour les échantillons provenant d'épidémies européennes (Hambourg, Constantinople, Paris), présentait au contraire un pouvoir beaucoup plus faible, presque nul même, vis-à-vis d'un échantillon isolé des selles d'un cholérique de l'Inde.

La réaction agglutinante qui, pour le bacille d'Eberth est pour ainsi dire le privilège de l'espèce, quelle que soit la source de l'échantillon microbien, n'est plus, pour le choléra, l'apanage de l'espèce et semble devenir déjà une qualité inhérente à chaque race cholérigène.

Pour les microbes qui vivent à l'état saprophytique dans l'organisme humain (pneumocoque, colibacille, etc.) la réaction devient encore, si l'on peut dire, moins spécifique. Pour le pneumocoque, nous l'avons vu, un sérum qui agglutine un échantillon de pneumocoque peut rester sans action ou presque sans action sur un autre échantillon pneumococcique ayant les mêmes caractères que le premier, mais provenant d'une autre source.

Pour le colibacille, Durham a vu que le sérum d'un animal

immunisé par un échantillon de colibacille, agglutine cet échantillon, mais n'agglutine pas ou n'agglutine que faiblement les autres colibacilles. M. Achard a fait une constatation analogue dans un cas. MM. Widal et Nobécourt ont montré, par des mensurations exactes du pouvoir agglutinatif des sérums, que les différents échantillons de colibacilles, recueillis sur l'homme sain ou malade, malgré leur aspect de similitude, sont complètement distincts. Pour M. Nobécourt, qui a repris cette étude dans sa thèse de doctorat, l'agglutination ne permet pas de caractériser une race spéciale de colibacille particulière aux infections gastro-intestinales aiguës d'été des jeunes enfants. Contrairement à l'opinion de M. Lesage, le sérum de chaque enfant n'agglutine que le colibacille retiré des selles du malade, et non le colibacille retiré d'un cas voisin.

Au début de nos recherches sur l'agglutination du pneumocoque¹, nous avons cru pouvoir parler de différenciation de races pneumococciques par la réaction agglutinante. Nous avons vainement recherché, depuis, si les lésions humaines déterminées par les différents échantillons séparés par l'agglutination, ne différaient pas en quelque point; si, pour prendre un exemple, la réaction agglutinante ne séparait pas le pneumocoque de la pneumonie franche de celui des pneumonies bâtarde, infectantes. Or, aucune classification n'a été possible, et, seul, de l'analyse de toutes nos observations, s'est dégagé ce fait que le sérum du malade agglutinait toujours davantage le pneumocoque qui avait déterminé la lésion, et que parfois même il n'agglutinait que cet échantillon.

Le terme de race nous paraît donc impropre aujourd'hui pour caractériser des variétés de pneumocoques décelées par l'agglutination. Ce n'est pas parce qu'un pneumocoque est agglutiné par un sérum, tandis qu'un autre ne l'est pas, qu'il appartient à une race distincte : car il faudrait alors admettre qu'il y a presque autant de races de pneumocoques que de sujets atteints d'infection pneumococcique.

La réaction agglutinante nous apparaît, pour les espèces saprophytes, comme un réactif trop délicat pour servir de base à une classification, elle sépare non pas des espèces, non pas même des races, mais des échantillons microbiens.

1. BEZANÇON et GRIFFON. *Presse médicale*, 31 juillet 1898.

Pour ce qui est, en effet, de ces microbes saprophytes, chaque échantillon acquiert, du fait de son séjour dans l'être qui l'héberge, une sorte d'individualité.

Cette individualité ne se décèle ni par des caractères différents de morphologie ou de culture, ni par des lésions dissimilables si le microbe devient pathogène. Quelle que soit sa source, le pneumocoque détermine dans le parenchyme pulmonaire une réaction pathologique toujours identique à elle-même. l'alvéolite fibrineuse. L'individualité de l'échantillon microbien ne se traduit que dans les réactions humorales, par des différences dans la séroréaction agglutinante, par exemple, et peut-être aussi, par des réactions vaccinales distinctes¹.

1. Il est du plus haut intérêt d'établir si un sérum préventif à l'égard de l'échantillon de pneumocoque qui a servi à la vaccination, préserve également contre tout autre échantillon de pneumocoque. Des expériences actuellement en cours nous fixeront sur ce point.

Dès aujourd'hui, nous croyons pouvoir mettre en relief combien le fait que la séroréaction agglutinante, en ce qui concerne le pneumocoque et le colibacille, est une réaction quasi individuelle, éclaire la question si controversée de l'unité ou de la pluralité des races streptococciques. Si, pour des raisons de technique, la séroréaction agglutinante n'a pu être appliquée à la solution de cette question il n'en est pas de même de la réaction d'immunité de Pfeiffer. Or, toutes les recherches expérimentales aboutissent à cette conclusion que, pour le streptocoque, le sérum d'animaux vaccinés n'a de propriétés préventives ou thérapeutiques réelles que vis-à-vis de l'échantillon de streptocoque qui a servi à la vaccination. Il ne s'ensuit pas que tous ces échantillons différents constituent des espèces streptococciques distinctes. De même que la réaction agglutinante pour le pneumocoque, la réaction d'immunité ne peut, pour le streptocoque, suffire à établir une classification en espèces différentes.

Loin d'être en désaccord, comme on aurait été tout d'abord tenté de le croire, avec la théorie de l'unité des races streptococciques soutenue par l'un de nous avec M. Widal* et admise par M. Marmorek**, ces notions nous ramènent, après une nouvelle étude du problème, à la conception uniciste qui seule cadre avec l'observation clinique,

* WIDAL et BEZANÇON. Les streptocoques de la bouche normale et pathologique. *Société Médicale des hôpitaux*. Séance du 27 juillet 1894.

** MARMOREK. *Annales de l'Institut Pasteur*, année 1895, page 593.

ERRATUM

Dans l'article de M. Metchnikoff, inséré dans le dernier n° des *Annales*, il s'est glissé une erreur qu'il faut corriger ainsi: p. 371, ligne 18, au lieu de « ce complément », lire: « la substance intermédiaire ».

DE L'INFLUENCE DE LA TOXINE TÉTANIQUE SUR LE SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

PAR MICHEL JOUKOWSKY

(Travail du laboratoire de M. Metchnikoff.)

Les modifications qui se produisent sous l'influence de la toxine tétanique ont été déjà étudiées à plusieurs reprises, et surtout depuis l'introduction dans la technique histologique de la méthode de Nissl pour la coloration des cellules nerveuses. Cette méthode, si précieuse pour dévoiler la structure de ces cellules, ne fournit pourtant pas des conclusions précises quant à l'anatomie pathologique. Comme preuve à l'appui de ce que je viens de dire, je vais citer quelques récents travaux, laissant de côté les études anciennes.

La méthode de Nissl fut appliquée pour la première fois à l'étude du système nerveux dans l'intoxication tétanique par Beck (1) et Nissl (2) lui-même, ensuite par Marinesco (3). Ce dernier a, comme les deux premiers, observé dans les cellules de la moelle épinière, la raréfaction et la dissolution de la substance chromatophile, la désintégration et coagulation du protoplasma. Il décrivit des hémorragies dans les cornes antérieures et postérieures de la moelle (surtout dans les cornes antérieures), et en outre il signala une augmentation du nombre des noyaux de la névroglie.

Goldcheider (4) et Flatau firent de nombreuses expériences avec la toxine tétanique ainsi qu'avec l'antitoxine, et arrivèrent à la conclusion que la toxine tétanique produit un gonflement des noyaux, une augmentation partielle et plus tard la désagrégation des corpuscules de Nissl, enfin une augmentation de volume de la cellule tout entière. Ces modifications sont d'autant plus nettes que l'intensité du virus est plus grande. D'après

ces observateurs, les cellules ne réagissent pas toutes de la même façon, de sorte qu'on peut voir différents états dans des cellules voisines. Il existe aussi une différence dans le degré des modifications morphologiques selon l'animal. Ils n'ont pas remarqué de corrélation précise entre l'intensité des phénomènes de l'intoxication et le degré de modification anatomopathologique.

Hunter (5), à l'examen des moelles épinières de trois personnes mortes de tétanos, trouva dans le premier cas une forte congestion, une hémorragie intersticielle et des modifications insignifiantes des cellules; dans le second cas, congestion, changements cellulaires insignifiants et absence d'hémorragie; enfin, dans le troisième cas, congestion et absence de changements histologiques.

La même année, Claude (6) décrivit les changements particuliers qui se produisent à la suite de l'intoxication tétanique expérimentale, et dont les observateurs précédents ne font pas mention. Chez un chien qui avait reçu de faibles doses de toxine et qui survécut à cette intoxication, il constata, le vingt-troisième jour, une paralysie avec contracture, et à l'examen microscopique de la moelle épinière de cet animal, il trouva des modifications aussi bien dans le noyau des cellules que dans la substance chromatophile. Il y avait, en outre, des foyers de myélite, surtout autour des cornes postérieures et, enfin de faibles modifications dans les nerfs, le nerf sciatique en particulier.

Chantemesse et Marinesco (7) ont trouvé des modifications variées dans les cellules de la moelle des cobayes morts à la suite de l'intoxication tétanique. Ces modifications consistaient en un gonflement du corps cellulaire, une coloration diffuse de la substance chromatique, un épaissement de la membrane du noyau, une diminution de volume du nucléole, et une coloration du cylindre-axe qui devenait en outre granuleux. Si, en même temps que la toxine, on introduisait dans le corps de l'animal de l'antitoxine, on observait l'augmentation de volume des cellules du noyau et du nucléole : ce dernier était plus faiblement coloré.

Ces phénomènes disparaissaient au bout d'un certain temps.

Chez les cobayes qui ont reçu une dose mortelle de toxine et 24 heures plus tard une dose thérapeutique de sérum (l'animal

fut sacrifié le cinquième jour), on constata la faiblesse de coloration, la désintégration de la substance chromatophile et la chromatolyse. Chez un cobaye ayant reçu de la toxine et de l'antitoxine et sacrifié au bout de 75 heures, la moelle ne présentait aucun changement.

Matthis (8) étudia deux cas de tétanos chez l'homme. Un a duré 17 jours et l'autre 12. Dans le premier, à l'examen anatomo-pathologique, on trouva une forte hyperémie et des hémorragies, ainsi que des modifications cellulaires consistant en un gonflement des corpuscules de Nissl, en leur fine désagrégation, en une accumulation du pigment dans les cellules et une diminution de nombre de leurs prolongements. Le nucléole dans plusieurs cellules était fortement coloré et d'un aspect anguleux. Quelquefois il devenait plus clair ou bien désagrégé.

Dans le second cas, on ne constata aucune modification dans les cellules de la moelle. C'est pourquoi l'auteur ne considère pas les modifications du premier cas comme propres au tétanos. Elles sont, selon lui, dues en partie à l'hyperémie de la moelle.

Donetti (9), non plus que Matthis, ne considère pas ces altérations comme symptomatiques du tétanos : la contracture, selon lui, est un phénomène réflexe ne dépendant point des lésions spéciales ni du système nerveux central, ni des nerfs, ni des muscles. Dans un cas de tétanos qu'il a étudié chez l'homme, il constata l'existence d'une myélite aiguë centrale avec atrophie des cornes antérieures, et destruction des grandes cellules pyramidales. Les lésions pathologiques s'étaient localisées dans la partie lombaire de la moelle autour du canal central, bien que les contractures fussent généralisées.

Péchoutre (10), de même que les auteurs précédents, ne considère pas les lésions qu'on rencontre comme propres au tétanos. Dans le tétanos expérimental chez les lapins, il trouva, comme chez l'homme, des altérations des cellules portant sur les éléments chromatophiles et le noyau. Ces altérations sont les suivantes : augmentation de volume de la cellule, coloration diffuse de la substance chromatophile, dissémination irrégulière des granulations de Nissl, disparition partielle ou totale des contours de la cellule, augmentation de volume et de coloration du noyau, qui se plaçait excentriquement, et enfin amplification du

nucléole. Telles sont les modifications que l'auteur a rencontrées dans plusieurs cas.

Rispal (11) a étudié deux cas de tétanos chez l'homme. Dans l'un il rencontra le gonflement et la chromatolyse des cellules des cornes antérieures de la moelle; dans l'autre la dégénérescence hyaline et la déformation du noyau dans la même région. Dans le premier cas, les modifications étaient semblables à celles qu'on rencontre dans l'empoisonnement par la toxine tétanique. Quant au second, les altérations rappelaient celles qui se produisent sous l'influence d'une haute température.

Nageotte et Ettlinger (12) ont observé la chromatolyse, la vacuolisation et la fissuration des cellules dans l'intoxication par la toxine tétanique. Les altérations n'étaient ni constantes, ni en corrélation avec les contractures.

Courmont, Doyon et Paviat (13) donnent une description détaillée des phénomènes pathologiques chez les animaux, aussi bien dans le tétanos généralisé que dans le tétanos localisé, tant chez les animaux sacrifiés que chez ceux qui moururent spontanément. La contracture tétanique n'est pas pour eux une fonction des centres nerveux.

Nuck et Moor (14) observèrent, dans le système nerveux central des cobayes, des modifications semblables à celles dont parlent Nageotte et Ettlinger. Ils partagent aussi l'avis de Courmont et de Paviat sur la non spécificité de ces lésions. D'après eux, ces lésions se rencontrent dans d'autres infections, et leurs localisations ne correspondent pas aux contractures. Ces dernières dépendent très probablement, non du système nerveux central, mais de l'intoxication de la partie périphérique du neurone.

Après ce résumé sommaire des travaux existants, je passe à mes propres recherches faites au laboratoire de M. le professeur Metchnikoff et sous sa haute direction.

Mes expériences ont été faites sur des cobayes, qui furent intoxiqués par la toxine tétanique sèche. Les doses ont varié de 0,005 de millig. à 0,01, 0,04, 0,1 de milligr., de sorte que j'ai observé des cas aigus aussi bien que des cas chroniques.

Pour l'examen microscopique, on prenait des coupes sur des animaux sacrifiés, soit après l'apparition des phénomènes du

tétanos généralisé, soit quand ils ne présentaient que les contractures localisées, et enfin sur ceux qui succombaient spontanément.

En outre, j'ai pu examiner le système nerveux central d'un homme mort du tétanos. Ce cas a été mis à ma disposition par M. le professeur P. Marie, auquel je présente mes remerciements.

Dans toutes mes expériences, la moelle a été traitée par la méthode de Nissl, avec substitution du bleu de toluidine à la place du bleu de méthylène. Cette modification de la méthode de Nissl a les avantages suivants : avec la toluidine, la coloration des cellules nerveuses est plus intense, elle se conserve mieux ; les leucocytes, les noyaux de la névroglie et ceux de l'endothélium des vaisseaux se colorent aussi très bien. Dans plusieurs cas, j'avais associé cette coloration à une autre faite avec une faible solution d'éosine. Je trouve cette combinaison très utile, car, outre que les cellules nerveuses, les noyaux de la névroglie et les leucocytes sont colorés par le bleu de toluidine, on obtient aussi la coloration en rose des mailles de la névroglie et des globules rouges du sang. De sorte que, sur des préparations traitées par ces procédés, on observe mieux les modifications subies par les vaisseaux du tissu nerveux, que sur celles traitées par la méthode pure de Nissl.

Les modifications du système nerveux central que j'ai étudiées sur de nombreux cobayes et sur un homme sont si variées que je ne veux pas en faire d'emblée une liste. Je préfère décrire séparément l'intoxication aiguë et l'intoxication chronique. Ensuite, j'indiquerai lesquelles des modifications paraissent être les plus fréquentes, et lesquelles ne se rencontrent que très rarement.

J'ai constaté que sur les coupes du système nerveux central des cobayes adultes, empoisonnés par des doses mortelles de toxines et sacrifiés après l'apparition des phénomènes tétaniques généralisés, les modifications des cellules nerveuses étaient si insignifiantes, que dans un cas il fut même impossible de percevoir la moindre différence entre les cellules nerveuses de ces coupes et celles du système nerveux normal.

Dans d'autres coupes, on voyait un petit nombre de cellules présentant la raréfaction de la substance chromatophile, et des cellules ayant subi la chromatolyse périphérique. Ces dernières

étaient disséminées tout le long de l'axe cérébro-spinal, sans aucune corrélation avec les régions des contractures. On rencontrait aussi des cellules colorées en bleu foncé sans délimitation précise des corpuscules de Nissl, mais ayant le noyau coloré et la substance achromatique.

Le plus souvent, les cellules modifiées se rencontraient dans le groupe antérieur des cornes antérieures de la moelle et tout autour du canal central.

Ce qui prédominait dans les cas d'empoisonnement aigu, c'est l'augmentation de nombre des cellules rondes migratrices autour des cellules nerveuses, dans les espaces péricellulaires et sur les bords de ces espaces. Là, elles s'accumulaient en quantité beaucoup plus grande qu'à l'état normal.

Sur certaines coupes on voyait ces cellules migratrices entourer la cellule nerveuse et même pénétrer dans son protoplasma, où on trouvait une, deux et même plusieurs de ces cellules migratrices. Ce phénomène s'observait surtout dans les cas d'intoxication chronique, plus rarement dans l'empoisonnement aigu.

Il se rencontrait dans les parties de la moelle qui entourent le canal central et dans les cellules du groupe antérieur des cornes antérieures; dans le groupe externe des cellules on le voyait plus rarement.

Le même phénomène se reproduisait dans le bulbe.

Les cellules nerveuses autour desquelles s'accumulaient les éléments migrants, avaient la substance chromatophile en état de raréfaction, ou bien présentaient le phénomène de la chromatolyse partielle. Dans d'autres cas, elles paraissaient être tout à fait normales quant à l'état morphologique, c'est-à-dire que la méthode de Nissl ne divulguait aucune modification, sauf cependant ceci : à l'endroit même où la cellule ronde migratrice pénétrait dans la cellule nerveuse, on remarquait la disparition de la substance chromatophile.

Les cellules migratrices qui s'accumulaient autour de la cellule nerveuse, étaient souvent plus riches en substance chromatophile que celles qui étaient disséminées dans le tissu environnant.

Quant à la nature de ces cellules migratrices, les unes, par leur aspect extérieur, rappelaient parfaitement les leucocytes

mononucléaires, tandis que d'autres semblaient être les noyaux de la névroglie.

Chez deux cobayes nouveau-nés, intoxiqués par des doses mortelles (dont l'un fut sacrifié 30 heures après l'injection de la toxine, ayant une contracture partielle d'une patte postérieure, l'autre 52 heures après, présentant les signes du tétanos généralisé), les altérations consistaient principalement en une accumulation des cellules migratrices autour des cellules nerveuses. Chez le cobaye atteint de tétanos généralisé, on put voir que certaines cellules de la moelle avaient le nucléole éclairci.

Chez deux cobayes empoisonnés par des doses faibles de 0,005 de mgr., sacrifiés 7 jours après, ayant présenté des contractures partielles, on observa dans le système nerveux central les modifications suivantes :

Chez le premier cobaye, pesant 470 grammes, les cellules nerveuses avaient subi des altérations insignifiantes : certaines seulement présentaient la chromatolyse partielle, ou totale, mais ni le noyau, ni le nucléole ne paraissaient atteints. Ce qui prédominait dans ce cas, c'est l'augmentation considérable du nombre des cellules migratrices et leur pénétration dans le protoplasma des cellules. Ce phénomène s'observait tout le long de l'axe cérébro-spinal, aussi bien dans la moelle que dans le bulbe : il se localisait particulièrement autour des cellules du groupe antérieur des cornes antérieures, et tout autour du canal central. Dans la région lombaire de la moelle, ce phénomène était le plus manifeste. Sur plusieurs coupes du bulbe on l'observait aussi très nettement.

En comparant les coupes de ces deux cas avec celles prises sur les animaux ayant subi l'intoxication aiguë, on constate que ce phénomène est beaucoup plus prononcé dans les premières que dans les dernières. Dans certaines coupes de la moelle d'un des deux cobayes susmentionnés, on voyait parfois des cellules nerveuses, abondamment recouvertes de tous les côtés par des cellules migratrices qui y pénétraient par deux, trois et plus.

On observait le même phénomène dans le bulbe. Chez le second cobaye, pesant 520 grammes, ces phénomènes étaient légèrement atténués. En outre, chez cet animal, dans plusieurs cellules de la moelle et du bulbe, le nucléole avait disparu.

Chez le troisième, qui a reçu 0.04 de milligr. de toxine sèche,

qui a vécu 14 jours, et qui est mort avec contractures généralisées, j'ai constaté, outre l'accumulation des cellules rondes migratrices autour des cellules nerveuses et leur pénétration dans le protoplasma de ces dernières, que les cellules nerveuses mêmes ont subi des changements : leur substance chromatophile se raréfiait et ses corpuscules se divisaient en fines granulations : le nucléole des noyaux se gonflait. Souvent aussi le nucléole prenait une forme anormale d'un as de cœur, ou bien il devenait plus clair au milieu, et avait la circonférence teinte en bleu foncé.

On rencontrait enfin des cellules dans lesquelles le nucléole était finement désagrégé.

Dans d'autres cas chroniques (dont un que j'ai observé moi-même : la description des autres m'a été obligeamment communiquée par le docteur Maïkoff), les altérations du système nerveux central furent extrêmement variées. Ainsi dans un cas il y avait l'accumulation de la substance chromatophile autour du nucléole des cellules, dont le protoplasma se trouvait dans l'état de chromatolyse presque totale. Dans l'autre on voyait des cellules avec la chromatolyse centrale, ou bien encore des cellules ratatinées sans nucléole ni noyau, et colorées uniformément en bleu foncé. Dans un autre cas encore, on observait des cellules avec accumulation de la substance chromatophile autour du nucléole, et des cellules avec la substance chromatophile transformée en une poussière, avec des cellules faiblement colorées ayant la substance chromatophile raréfiée.

Telles sont les modifications cellulaires qu'on observa dans plusieurs cas. Une fois, dans un cas chronique, on ne constata que l'accumulation des cellules migratrices et une certaine raréfaction de la substance chromatophile.

Les cellules modifiées étaient disséminées dans différentes parties de la moelle ; elles n'avaient pas de corrélation avec les phénomènes physiologiques, il est impossible de leur assigner une localisation. On peut dire seulement qu'on les rencontrait plus souvent dans le groupe antérieur des cornes [antérieures de la moelle, et autour du canal central.

On peut dire en général que dans ces cas, ainsi que dans les cas précédents, les phénomènes prédominants furent : l'accumulation des cellules migratrices autour des cellules nerveuses

et leur pénétration dans le protoplasma de ces dernières. Ces phénomènes se produisaient avec plus ou moins grande intensité, selon le cas, et ils étaient plus accusés dans l'intoxication avec évolution lente que dans celle à marche aiguë.

Je veux décrire maintenant les modifications que j'ai observées dans un cas de tétanos céphalique chez l'homme. Cette description complètera le tableau du tétanos expérimental chez les animaux (16).

Je résume, en quelques mots, la marche de cette maladie :

Les symptômes furent les suivants : trismus, paralysie double du nerf facial, accès d'étouffement. La maladie a duré 12 jours, dont les 4 premiers constituent la période d'incubation.

A l'autopsie on trouva une hyperémie de l'encéphale et de la moelle épinière. A l'examen microscopique du bulbe, de la moelle épinière et de la substance grise de l'écorce cérébrale, faite d'après la méthode de Nissl avec la coloration supplémentaire par l'éosine, on constata les altérations suivantes :

Sur les coupes prises sur l'écorce cérébrale, dans la région motrice, il y eut une forte augmentation de pigment jaune clair des cellules, surtout des cellules géantes. Cette augmentation fut parfois si forte que le pigment occupait plus de la moitié de la cellule, tandis que l'autre partie était remplie par la substance chromatophile parfaitement intacte.

Cette énorme quantité de pigment est un phénomène pathologique dû à la dégénérescence pigmentaire de la cellule. Le malade était, il est vrai, d'un âge avancé (61 ans), mais ce n'est pas l'influence de l'âge qui en fut la cause, car le phénomène a été trop intense. La même accumulation du pigment se rencontrait dans le bulbe et la moelle épinière. Dans cette dernière, c'était surtout les cellules des cornes antérieures de la région cervicale qui furent altérées. Ici, dans la plupart des cas, on observa les faits suivants : disparition totale ou bien presque totale de la substance chromatophile et sa substitution par des granules jaune clair, absence du noyau dans un grand nombre de cellules, tandis que, dans d'autres, ils existaient, mais étaient refoulés vers la périphérie. En outre, dans le bulbe ainsi que dans la moelle, surtout dans sa partie cervicale, et spécialement dans les cornes antérieures et autour du canal central, on ren-

contraît souvent des cellules avec chromatolyse centrale. Enfin, sur plusieurs coupes de la moelle ainsi que sur celles du bulbe, on pouvait voir des cellules dont les corpuscule de Nissl étaient gonflés. La substance achromatique, ainsi que le noyau, se coloraient en bleu foncé. Quant à l'accumulation des cellules migratrices autour des cellules nerveuses, on la rencontrait très rarement, et ce fut surtout sur quelques coupes de la moelle épinière.

Outre les modifications cellulaires, on observait dans ce cas une forte dilatation par le sang des vaisseaux du cerveau et de la moelle épinière, et sur certaines coupes du bulbe, des extravasations.

Les altérations pathologiques des cellules nerveuses qu'on a observées chez les animaux et chez l'homme dans les cas d'empoisonnement par la toxine sont très variées. Le plus souvent ce sont : la raréfaction de la substance chromatophile et la chromatolyse. Ces phénomènes étaient d'une intensité variable selon les cas, et même parfois ils faisaient défaut.

Selon l'opinion actuelle, la chromatolyse n'est pas un phénomène pathognomonique de telle ou telle maladie, mais elle se rencontre toutes les fois qu'il y a altération de l'intégrité anatomique ou fonctionnelle de la cellule (Van Gehuchten). D'après une autre opinion, ce phénomène se produit pendant la vie de la cellule, et est plutôt biologique qu'anatomo-pathologique (Donetti).

Il semble qu'il faut admettre que la chromatolyse de la cellule nerveuse ne témoigne pas de l'altération des fonctions de la cellule et, comme preuve à l'appui de cette assertion, on peut citer le cas de Déjerine qui constata ces modifications des cellules nerveuses de la moelle chez une femme morte de pneumonie, et chez laquelle il n'y avait aucune modification ni dans les mouvements ni dans la sensibilité. C'est pourquoi, dans nos expériences, il est impossible d'attribuer à ce phénomène une signification spéciale.

Le signe le plus important de l'altération de la cellule nerveuse est la modification du noyau et du nucléole. Mais ce phénomène non plus n'était pas constant, il ne se rencontrait que dans quelques cas, c'est pourquoi il ne peut pas non plus

être considéré comme un signe caractéristique de l'empoisonnement par la toxine.

On peut dire la même chose de la pigmentation des cellules. Ce phénomène est encore moins caractéristique que les précédents, puisqu'il se rencontre dans le système nerveux pendant ses différents processus chroniques, ainsi que sous l'influence de l'âge (Obersteiner, Kosturine, Marinesco).

Quant aux cellules colorées uniformément en bleu foncé, sans délimitation distincte des corpuscules de Nissl, avec un noyau coloré et la substance achromatique, on peut en voir de pareilles sur des cerveaux d'animaux parfaitement sains.

La diversité des modifications des cellules, leur inconstance et la variation selon chaque cas, tout cela donne droit de ne pas compter ces altérations comme spécifiques de l'empoisonnement par la toxine du tétanos, et de ne les considérer que comme des phénomènes l'accompagnant.

Je ne veux pas dire par là qu'il n'existe point de ces signes spéciaux, mais il faudrait peut-être employer des méthodes d'investigation plus délicates encore que celles que nous appliquons. *

Il existe cependant un phénomène qui se rencontre souvent dans l'empoisonnement par la toxine tétanique, c'est l'accumulation des cellules rondes migratrices autour des cellules nerveuses, et leur pénétration dans le protoplasma de ces dernières. Vu la constance avec laquelle ce phénomène se retrouve, on pourrait le considérer comme spécial à cet empoisonnement.

Cependant, selon plusieurs travaux scientifiques, ce phénomène est très fréquent et se rencontre dans certaines infections et dans les maladies fonctionnelles et organiques des centres nerveux. Il ne serait, sans doute, que l'indice de l'épuisement fonctionnel des cellules nerveuses, soit par l'effet de la toxine sur la cellule nerveuse, soit par toute autre cause.

En effet, grâce aux travaux de Marinesco, Valenza, Pognat, Rispal, Anglade, Franca et Athias, il faut reconnaître que les cellules rondes migratrices prennent part à la destruction des cellules nerveuses, dès que ces cellules sont altérées par quelque agent nocif ou tout simplement par la vieillesse (Pognat).

Ce trouble est manifesté histologiquement par l'accumulation

des cellules migratrices autour des cellules nerveuses, et leur pénétration dans le protoplasma de ces dernières.

Marinesco (17) a étudié ce phénomène dans l'empoisonnement des animaux par la toxine du Botulisme, Valenza (18) dans la cautérisation du cerveau, Rispal (19) dans la chorée, Anglade (20) dans l'éclampsie, Franca et Athias (21) dans l'épilepsie et la démence paralytique.

Enfin beaucoup d'auteurs ont constaté ce fait à l'examen du cerveau d'hommes morts de différentes maladies sans l'expliquer.

Ainsi Z. Popoff (22) a observé dans la fièvre typhoïde la pénétration des leucocytes dans les cellules nerveuses, N. Popoff (23) dans le choléra, Joukovsky (24) dans le délire aigu, Turner (25) dans les maladies diffuses mentales, Matchhenko (26) dans la démence secondaire.

L'origine de ces éléments migrants est encore douteuse ; ce qui ne l'est pas, c'est leur rôle dans la destruction des cellules nerveuses dès que celles-ci ont subi l'effet de quelque agent nuisible.

Par conséquent l'accumulation des cellules rondes migratrices autour des cellules nerveuses, et leur pénétration dans le protoplasma de ces dernières doit être considérée comme une marque de la diminution de la résistance de la cellule nerveuse sous l'influence de la toxine tétanique.

Tout en admettant cette explication de ce phénomène, nous avons à répondre encore aux questions suivantes :

1) Les cellules rondes migratrices sont-elles réellement destructrices de la cellule nerveuse ?

2) Détruisent-elles seulement les cellules nerveuses déjà mortes, ou bien aussi celles qui ne sont qu'affaiblies ?

3) Ce phénomène ne dépend-il pas, dans nos expériences, de l'influence de la vieillesse, ainsi que le suppose Pognat, et non de l'action de la toxine ?

En faveur du rôle actif des cellules migratrices est ce fait, que la pénétration de ces éléments dans le protoplasma des cellules nerveuses a lieu surtout alors que l'animal est empoisonné par une faible dose de toxine, contre laquelle il peut lutter, et au moment où les modifications des cellules sont insignifiantes.

Par conséquent, il y a une disproportion entre l'altération des cellules nerveuses d'une part, et l'accumulation des cellules migratrices de l'autre. ce qui prouverait le rôle actif de ces dernières, et démontrerait qu'elles attaquent non seulement les cellules mortes, mais aussi celles qui ne sont qu'affaiblies. On voit quelquefois des migratrices pénétrer dans des cellules qui, à l'examen histologique, ne présentent aucune modification.

Quant à la troisième question, on peut y répondre presque avec certitude que c'est sous l'influence de la toxine, et non de l'âge de l'animal, que les modifications se produisent, car elles sont aussi manifestes chez les cobayes nouveau-nés empoisonnés par la toxine que chez les vieux.

Ce phénomène trouve son explication dans la théorie sur la destruction des cellules dans l'organisme animal, récemment énoncée dans ces *Annales* (27) par M. le professeur Metchnikoff. D'après cette théorie, les cellules migratrices mononucléaires, les macrophages, deviennent destructrices des éléments nobles. dès que la force vitale de ces derniers est affaiblie par quelque agent nuisible.

D'accord avec cette théorie et d'après ce que nous avons déjà cité plus haut, nous devons considérer l'accumulation des cellules mononucléaires migratrices autour des cellules nerveuses, comme une manifestation de la phagocytose du tissu nerveux. et ces éléments migrants comme des macrophages dont le rôle est de détruire la cellule nerveuse tuée ou seulement affaiblie par la toxine tétanique.

Conclusions.

1) Dans l'empoisonnement par la toxine tétanique, on constate des modifications dans les cellules nerveuses de la moelle, et à un certain degré dans celles de l'encéphale. Ces modifications, qui concernent la substance chromatophile et le noyau, sont caractérisées par leur variabilité, leur inconstance et leur variation d'un cas à l'autre : c'est pourquoi on ne peut pas les considérer comme spéciales à cet empoisonnement.

2) Cependant il existe un fait, qui se rencontre le plus souvent. c'est l'accumulation des cellules migratrices mononucléaires autour des cellules nerveuses, et leur pénétration dans le protoplasma de ces dernières. Ce phénomène se produit chez les ani-

maux, surtout dans le groupe antérieur des cellules des cornes antérieures et autour du canal central. Il se manifeste avec le plus d'intensité dans les intoxications chroniques.

3) Ce phénomène doit être considéré comme l'expression de la phagocytose mononucléaire du tissu nerveux. Cette phagocytose se développe sous l'influence de la toxine sur la cellule nerveuse et sert de signe de mort ou tout au moins d'affaiblissement des éléments nerveux sous l'influence du virus.

En terminant, je m'empresse d'exprimer ma profonde reconnaissance à M. le professeur Metchnikoff pour m'avoir permis de travailler en son laboratoire et pour ses précieux conseils.

BIBLIOGRAPHIE ET NOTES

- 1) BECK, *Neurologisches Centralblatt*, 1894.
- 2) NISSL, *Centralblatt f. Nervenheilk*, 1896.
- 3) MARINESCO, *Société de Biologie*, 1896. — *Congrès de Moscou*, 1897.
- 4) GOLDSCHIEDER et FLATAU, *Congrès international de médecine*, Moscou, 26 août 1897. — *Fort. der Medicin*, 1897. N. 316. — *Normale und Pathologische Anatomie der nervenzellen auf Grund der nerven Forschungen*. Berlin, 1898.
- 5) HUNTER, *Brit. medic. journ.*, 1897.
- 6) CLAUDE, *Presse médicale*, 1897, CCLXXVIII.
- 7) CHANTEMESSE et MARINESCO, *Presse médicale*, n° 19, 1898.
- 8) MATTHIS, *Deutsche Zeitschrift f. Nervenheilkunde*, 1898, Bd 43, H. 5 et 6.
- 9) DONETTI, *Revue neurologique*, 1898.
- 10) PECHOUTRE, *Société de Biologie*, 1898, page 174. — *Thèse de Paris*.
- 11) RISPAL, *Congrès à Montpellier*, du 12 au 17 avril 1898. — *Revue neurologique*, 1898, page 381.
- 12) NAGEOTTE et ETLINGER, *Société de Biologie*, 1898. — *Presse médicale*, 1898.
- 13) COURMONT, DOYON et PAVIAT, *Archives de Physiologie*, t. X, pages 454 et 472.
- 14) BUCK MOOR, *Bull. de l'Académie de médecine de Belgique*, 1899.
- 15) J'ai observé 4 cas de tétanos chronique. Les autres observations m'ont été communiquées par le Dr Maikoff, qui intoxiquait les animaux par des faibles doses de toxine tétanique.
- 16) La relation détaillée clinique de ce cas fera l'objet d'une communication que présentera M. Crauson, interne de M. le professeur Marie.

- 17) MARINESCO, *Société de Biologie*, 1896, page 382.
- 18) VALCUZA, *Société de Biologie*, 1896, page 1135.
- 19) RISPAL, *Congrès des médecins aliénistes et neurologistes*, Marseille, avril 1899. — *Revue de Psychiatrie*, 1899, n° 55.
- 20) ANGLADE, *Mêmes recueils*.
- 21) FRANCA et ATHIAS, *Société de Biologie*, 1899.
- 22) L. POPOFF, *Des changements dans le cerveau dans la fièvre typhoïde et le typhus*. Varsovie, 1882.
- 23) N. POPOFF, *Les changements pathologiques du système nerveux central dans le choléra asiatique*. Varsovie, 1893.
- 24) JOUKOVSKY, *Les changements pathologiques dans le délire aigu*. — *Revue de Psychiatrie russe*, 1898, n° 5.
- 25) JOHN TURNER, *The journal of mental science*, 1898.
- 26) MATCHENKO, *Des changements pathologiques de l'écorce du cerveau dans la démence secondaire*.
- 27) *Étude sur la résorption des cellules*. *Ann. de l'Institut Pasteur*, 1899 n° 10.

EXPLICATION DE LA PLANCHE

(1-2. — Les cellules non altérées des cornes antérieures de la moelle du cobaye.

(3. — Une cellule de la moelle du cobaye entourée de cellules migratrices mononucléaires. La plupart de ces dernières ont pénétré dans le protoplasma de la cellule nerveuse.

(4-5. — Cellules à différents états de la chromatolyse.

(6. — Une cellule du bulbe du cobaye. On voit dans le protoplasma de cette cellule des éléments migrants mononucléaires.

(7-8. — Cellules de l'écorce cérébrale de la région motrice de l'homme. On voit une énorme quantité de pigment.

(9. — Corne antérieure de la moelle chez l'homme. On voit les modifications des cellules et l'hyperémie des vaisseaux.

(10-12. — Cellules de la moelle d'un cobaye. On voit l'accumulation de la substance chromatophile autour du nucléole. La protoplasma des cellules est en état de chromatolyse.

DE L'IDENTITÉ DU BACILLE LACTIQUE AÉROGÈNE

ET DU

PNEUMO-BACILLE DE FRIEDLÆNDER

PAR MM. L. GRIMBERT ET G. LEGROS

Le *bacillus lactis aerogenes* (Escherich), agent essentiel de la fermentation spontanée du lait (Flügge), mis en cause dans certaines infections urinaires¹, péritonéales² et méningées³, possède-t-il une individualité propre? Doit-on le considérer comme une espèce distincte du Pneumo-bacille de Friedlænder avec lequel il offre tant de points de ressemblance?

Denys et Martin⁴, s'appuyant sur les caractères morphologiques des deux espèces et sur les résultats de l'inoculation aux animaux, concluent notamment à l'identité; d'autre part, les auteurs qui la repoussent ne donnent comme éléments de différenciation que des caractères secondaires ou inconstants.

Nous avons donc pensé qu'il était utile de reprendre la question en complétant l'étude morphologique de ces bacilles par celle de leurs propriétés biochimiques, dans le but d'obtenir de nouveaux caractères soit de différenciation, soit de rapprochement.

Les résultats obtenus pouvaient accessoirement nous permettre une rapide comparaison de nos bacilles aérogènes types avec certaines espèces bactériennes désignées, très inutilement selon nous, sous le nom de paracoli-bacilles: paracoli-bacilles ne donnant pas d'indol — inactifs sur le lactose — immobiles⁵.

1. MOREL, *La Cellule*, t. VII, 2, p. 241. WOBURG, *Münch. med. Woch.*, 18 juillet 1899. HEYSE, *Zeitsch. f. Klin. Med.* XXIV, p. 430.

2. FROENKEL, *Wien. Klin. Woch.* n° 13, 14, 15. 1891.

3. A. SCHEID, *Prager Med. Woch.* n° 15, p. 169, 1900.

4. DENYS et MARTIN, *La Cellule*, 1893, p. 261.

5. GILBERT et LION, *C. R. Société de Biologie*, 18 mars 1893, et *Traité de médecine*, 1895, t. I, p. 626.

Nos recherches ont porté sur quatre bacilles lactiques aérogènes d'origines distinctes. L'un, dû à l'obligeance de M. Kayser, est le ferment *f* de ses travaux sur la fermentation lactique¹, il provenait du laboratoire de Nencki. Les trois autres avaient été isolés de fermentations lactiques spontanées.

Nous avons suivi dans l'étude de ces bacilles la marche proposée par l'un de nous dans les *Archives de Parasitologie*², et qui lui avait déjà servi dans son travail sur le Pneumo-bacille de Friedländer.

Disons de suite que nos trois bacilles lactiques, ainsi que le bacille *f* de Kayser, nous ont donné dans chaque épreuve les mêmes résultats. Les seules différences qu'on pouvait constater étaient des différences d'intensité. Par conséquent, nous ne les décrirons pas séparément, afin d'éviter des redites inutiles.

A. — BIOLOGIE GÉNÉRALE ET MORPHOLOGIE

Nos bacilles lactiques examinés en goutte pendante, sans coloration, sont immobiles.

Fréquemment les éléments d'une même culture sont polymorphes : on les rencontre souvent groupés par deux, placés bout à bout.

Ils prennent facilement les couleurs d'aniline, et se présentent alors sous l'aspect de bacilles courts à bouts arrondis, d'une longueur de $1\ \mu\ 5$ à $2\ \mu$, et un peu plus longs que larges.

Ils ne se colorent pas par la méthode de Gram.

Les essais de coloration de la spore, même après cultures sur le lait ou sur milieu lactosé, n'ont donné aucun résultat.

Dans les milieux de culture usuels, on ne trouve pas de capsules proprement dites ; nous les avons mises au contraire en évidence d'une manière à peu près constante dans le pus, le sang et les sérosités des animaux inoculés.

Ils sont anaérobies facultatifs.

La température optima de leur culture sur bouillon est voisine de 38° . Ils ne résistent pas à un séjour d'un quart d'heure à 60° .

1. KAYSER, ces *Annales*, t. VIII, p. 737, 1894.

2. L. GRIMBERT, De l'unification des méthodes de culture en bactériologie. *Archives de Parasitologie*, t. I, p. 494, 1898.

B. — CULTURES SUR MILIEUX USUELS

1^o *Bouillon peptonisé*. — A 37°5, on obtient un trouble uniforme en deux heures avec une espèce, en 4 heures avec une autre. Après 24 heures, apparaît un léger voile formant un anneau muqueux adhérent aux parois du tube. Quelques amas floconneux se déposent. Quand le voile se détache, il ne se renouvelle pas.

Le bouillon s'acidifie nettement. Il ne donne pas d'odeur appréciable.

2^o *Sur gélatine en plaques*. — On observe à 20° au bout de 48 à 60 heures des colonies superficielles punctiformes, transparentes au début, et qui s'accroissent en montrant un point central opaque; finalement elles deviennent saillantes et arrondies, formant de véritables perles blanches à reflets de porcelaine. Plus tardivement encore, la perle s'entoure parfois d'un disque blanchâtre, opaque, régulièrement arrondi, sur lequel elle reste saillante.

3^o *Sur gélatine en piqûre et en stries*. — On obtient en une semaine un clou à tête large, plus souvent aplati que convexe.

Le long de la piqûre, les colonies restent isolées en grains blancs sphériques. Souvent des bulles gazeuses, qui semblent traversées par la tige du clou, se développent dans l'épaisseur de la gélatine. Leur production varie avec la teneur naturelle en glucose du bouillon employé. L'adjonction à la gélatine de très faibles quantités de glucose donne lieu, quelques jours après l'ensemencement en profondeur, à de véritables projections en masse de la gélatine.

En strie, le bacille aérogène donne une bande blanchâtre humide à contours festonnés, peu transparente. Nous avons vérifié la modification possible de ces caractères d'opacité après passages sur milieux lactosés¹.

Dans aucun cas, la gélatine n'est liquéfiée.

4^o *Sur gélose*. — Strie blanchâtre, opaque, luisante, très visqueuse, à aspect de « colle d'amidon cuit très fluide² » coulant plus ou moins au fond du tube. La viscosité, assez nette dans les cultures sur bouillon et sur gélatine, est ici telle que l'anse de platine peut étirer des filaments de 15 à 20 centimètres de longueur.

Le développement sur gélose est rapide. A 37°5, la culture devient appréciable au bout de 3 à 5 heures.

5^o *Sérum de bœuf et sérum humain solidifiés*. — Colonies d'un blanc grisâtre, sans caractères spéciaux, assez visqueuses.

6^o *Pommes de terre*. — En 24 heures, se forme un enduit grisâtre ou café au lait clair qui augmente peu à peu, se fonce, se mamelonne et donne enfin de très nombreuses et très volumineuses bulles de gaz sur toute sa surface. Cette production gazeuse atteint son maximum en 4 ou 5 jours puis disparaît après 8 à 10 jours.

1. KROGJUS, *Archives de médecine expérimentale*, janvier 1892. — ACHARD et RENAULT, *C. R. Société de Biologie*, 9 avril 1892.

2. JOSSERAND et BONNET, *Archives de médecine expérimentale*, t. XI, p. 570

C. — ACTION SUR LES MATIÈRES AZOTÉES.

1° *Peptone*. — Nous avons donné le plus grand soin à l'étude de l'action de nos bactéries sur la peptone. La production d'indol par les bactéries du groupe *B. coli* est une des réactions les plus caractéristiques de ce groupe, *quand on sait la mettre en évidence*. Malheureusement, un grand nombre de savants semblent ignorer les conditions sévères de réussite imposées autrefois par Péré¹. L'ensemencement dans le bouillon peptoné n'est pas une épreuve suffisante, car la présence du bouillon gêne considérablement la production de l'indol quand elle ne l'empêche pas tout à fait. La nature de la peptone n'est pas non plus indifférente. Il n'est pas jusqu'à la dose de nitrite à ajouter qui n'ait son importance.

Si l'on a soin d'opérer sur de simples solutions aqueuses de peptone (peptone Collas, Catillon, Chassaing, etc.) préalablement éprouvées avec un *Coli type*, on aura entre les mains un réactif des plus sensibles permettant de différencier les bactéries du groupe *Coli* de celles du groupe *Friedländer*, que certains auteurs, entre autres Wilde², voudraient réunir en une seule famille.

Nous avons doncensemencé nos bactéries dans des solutions de peptone Collas à 3 0/0, et nous n'avons jamais constaté la formation d'une trace d'indol.

2° *Albumine cuite* : n'est pas modifiée.

3° *Lait*. — D'après Wilde² et Flügge³, le pneumo-bacille de *Friedländer* se distinguerait du bacille lactique aéro-gène en ce qu'il ne coagule pas le lait. Mais Denys et Martin⁴ ont montré que les cultures du *B. de Friedländer*, qui ne coagulent pas le lait, acquièrent cette propriété par des passages successifs dans ce milieu.

Tous nos bacilles aéro-gènes ont coagulé le lait en un temps variant de 48 heures à 5 jours. Le caillot de caséine rétracté n'est pas modifié ultérieurement. La réaction du sérum est for-

1. PÉRÉ, ces *Annales*, t. VII, p. 512, 1892.

2. MAX WILDE, Ueber den *Bacillus pneumoniae Friedländer's* und verwandte Bakterien. *Centralblatt F. Bakt.*, t. XX, p. 684, 1896.

3. FLÜGGE, *Die Mikroorganismen*.

4. DÉNYS et MARTIN, *La Cellule*, t. IX, p. 268, 1893.

tement acide. On observe un dégagement gazeux d'intensité variable qui s'exagère par addition de carbonate de chaux. Par conséquent, la coagulation a eu lieu par acidification.

4^o *Nitrates*. — Quand on met une bactérie en présence de nitrates, trois cas peuvent se présenter : 1^o le nitrate est décomposé avec dégagement gazeux : a) avec formation de nitrite; b) sans formation de nitrite.

2^o Le nitrate est réduit en nitrite sans dégagement gazeux;

3^o Le nitrate n'est pas attaqué.

Mais l'un de nous¹ a montré que ces réactions étaient sous la dépendance de la nature du milieu employé, et qu'il fallait établir une distinction entre les microbes qui font fermenter les nitrates en solution peptonée et ceux qui n'opèrent cette destruction qu'en présence des matériaux amidés du bouillon.

Les premiers, que nous nommerons *ferments directs*, ont pour type le B. pyocyanique; les seconds, *ferments indirects*, sont représentés par le B. Coli et le B. d'Eberth. On trouvera dans le mémoire cité l'explication du mode d'action de ces deux catégories.

Lorsqu'on ensemeince le pneumo-bacille de Friedländer ainsi que nos bacilles aérogènes dans une solution de peptone à 1 0/0, additionnée de 1 0/0 de nitrate de potasse pur, on ne constate aucun dégagement gazeux, mais le nitrate est réduit en partie à l'état de nitrite. Il n'en est plus de même quand on remplace la solution de peptone par du bouillon. En culture anaérobie, une véritable fermentation a lieu, et l'on peut constater que les gaz recueillis sont formés d'azote et d'acide carbonique.

Le pneumo-bacille de Friedländer et nos bacilles aérogènes se conduisent donc comme des ferments dénitrifiants indirects.

Enfin, et pour terminer cette longue série d'épreuves, nous avons constaté, comme l'a vu Balistreri², que nos bacilles aérogènes donnaient de l'hydrogène sulfuré quand on les ensemençait dans du bouillon peptoné additionné de soufre libre.

Tous les caractères que nous venons de décrire sont communs à nos bacilles et au bacille de Friedländer. Ils seraient

1. L. GRIMBERT, Action du B. coli et du B. d'Eberth sur les nitrates. *Ces Annales*, t. XIII, p. 67, 1899.

2. St. BALISTRERI, *Il Morgagni*, avril 1894.

déjà suffisants pour conclure à une identification complète, mais nous avons voulu pousser plus loin la comparaison en étudiant leur action sur les hydrates de carbone.

Cette étude était d'autant plus nécessaire qu'il est reconnu, après les travaux de Frankland¹ et de l'un de nous², qu'il existe au moins deux races de pneumo-bacilles morphologiquement semblables, mais possédant une action fermentative fort différente sur les hydrates de carbone.

La race de Frankland est sans action sur la glycérine et la dulcité et ne donne pas d'acide lactique avec les autres sucres, mais seulement de l'alcool éthylique, de l'acide acétique et de l'acide formique; tandis que la seconde attaque la glycérine et la dulcité et donne, soit de l'acide lactique gauche, soit de l'acide succinique, soit un mélange des deux, suivant la nature de l'hydrate de carbone consommé.

Cette dernière race comporte une variété possédant l'ensemble de ces propriétés fermentatives avec cette particularité qu'elle n'attaque pas la dulcité³, variété dont l'existence a été confirmée par Nicolle et Hébert, qui l'ont retrouvée dans un grand nombre d'angines⁴ et aussi dans un échantillon de vase de la Seine.

D. — ACTION SUR LES HYDRATES DE CARBONE.

Nos bacilles aérogènes ont été ensemencés dans des tubes à essai renfermant les solutions suivantes additionnées de peptone et de carbonate de chaux : glucose, lactose, saccharose, dextrine, mannite, dulcité et glycérine.

Tous les sucres ont fermenté, *sauf la dulcité*.

Il était intéressant de pousser plus loin l'expérience, et de voir si les produits formés dans ces fermentations étaient identiques à ceux que nous avait donnés autrefois le bacille de Friedländer dans les mêmes conditions.

Nous avons donc préparé une série de ballons renfermant 500 c. c. d'une solution sucrée à 3 0/0, additionnée de 2 0/0 de peptone et d'une quantité de carbonate de chaux suffisante pour neutraliser les acides formés. Après stérilisation et ensemence-

1. P. FRANKLAND, *Journal of chemical Society*, t. LIX, p. 253, 1891.

2. L. GRIMBERT, ces *Annales*, t. IX, p. 840, 1895.

3. L. GRIMBERT, ces *Annales*, t. X, p. 708, 1896.

4. CHARLES NICOLLE et A. HÉBERT, ces *Annales*, t. XI, p. 67, 1897.

ment, ces ballons étaient examinés au bout de 45 jours environ.

Nous ne reproduirons pas ici la technique employée pour l'analyse qualitative et quantitative des produits de la fermentation, elle est identique à celle que nous avons suivie dans nos recherches antérieures sur le pneumo-bacille de Friedländer.

Nos bacilles aérogènes donnent avec les hydrates de carbone, de l'alcool éthylique, de l'acide acétique, de l'acide lactique gauche et de l'acide succinique, et de même que le pneumo-bacille de Friedländer, ils semblent faire un choix entre les divers sucres offerts à leur activité. C'est ainsi que le glucose, la mannite et la glycérine ne donnent pas ou ne donnent que des traces d'acide succinique avec des quantités notables d'acide lactique gauche, tandis que la dextrine, au contraire, ne donne que de l'acide succinique à l'exclusion de l'acide lactique, et que le saccharose et le lactose donnent à la fois de l'acide succinique et de l'acide lactique. L'acide acétique se rencontre dans toutes les fermentations, ainsi que l'alcool éthylique, mais, pour ce dernier, les quantités formées varient avec la nature du corps fermentescible.

Voici les chiffres que nous avons obtenus avec un *B. aerogenes* isolé d'une fermentation spontanée du lait que nous désignerons par la lettre L, et avec l'échantillon d'aérogène type qui nous a été remis par M. Kayser. Ils se rapportent à 100 grammes de substance.

La durée de la fermentation a été en moyenne de 45 jours.

BACILLE L

	Alcool éthylique.	Acide acétique.	Acide lactique gauche.	Acide succinique.
Glucose.....	4,00	5,53	46,90	Traces.
Lactose.....	11,40	7,70	+	+
Succharose....	10,00	9,23	+	+
Mannite.....	26,66	4,03	54,33	Traces.
Glycérine.....	23,33	4,36	20,23	0
Dextrine.....	3,80	6,46	0	9,03

BACILLE KAYSER

	Alcool éthylique.	Acide acétique.	Acide lactique gauche.	Acide succinique.
Succharose.....	13,33	5,76	+	+
Mannite.....	33,00	7,63	29,86	Traces.
Dextrine.....	6,66	9,70	0	16,06

Ces chiffres sont donnés à titre de renseignement et ne sauraient servir de base à des comparaisons trop étroites.

On sait, en effet, que l'équation d'une fermentation varie à chaque instant sous l'influence de facteurs parmi lesquels l'âge et l'éducation de la semence jouent le principal rôle; on ne saurait donc espérer avoir des chiffres absolument identiques en employant des semences d'origine différente, mais ce sur quoi on est en droit de compter, c'est sur des réactions de même ordre. Or, nous voyons ici que les fonctions biologiques manifestées par nos bacilles aérogènes sont identiques à celles du pneumo-bacille de Friedländer étudié autrefois par l'un de nous. Dès lors tombent toutes les barrières qu'on a voulu élever entre les deux organismes, et à moins de vouloir s'appuyer sur des caractères sans valeur comme la teinte plus ou moins foncée que prennent certaines cultures sur gélatine, on est bien forcé de reconnaître que le bacille décrit sous le nom de bacille lactique aérogène n'est autre chose que le pneumo-bacille de Friedländer et que tous deux n'ont droit qu'à un nom unique. Bien entendu l'espèce Friedländer peut comporter un certain nombre de variétés; l'absence d'action sur la dulcité des bacilles que nous avons étudiée en est une preuve, mais ces variétés, sous la dépendance de l'éducation de la semence, présentent un ensemble de propriétés communes suffisamment nettes pour permettre de les réunir en un groupe unique dont les caractères sont :

1° L'immobilité; 2° la présence des capsules dans le sang des animaux inoculés; 3° la non-liquéfaction de la gélatine; 4° la non-production d'indol; 5° l'action énergique sur les hydrates de carbone donnant naissance à de l'alcool éthylique, à de l'acide acétique, et, suivant la nature des sucres, à de l'acide lactique ou à de l'acide succinique, ou bien encore à un mélange des deux.

On pourra nous faire observer que les bacilles du groupe *Coli* présentent certaines de ces réactions, notamment l'action sur les hydrates de carbone, mais ils se distingueront toujours des bacilles du groupe Friedländer : 1° par leur mobilité (encore qu'elle soit variable); 2° par l'absence de capsule dans le sang des animaux inoculés; 3° et surtout par la production d'indol dans les solutions de peptone.

LES VACCINATIONS ANTIRABIKES A L'INSTITUT PASTEUR

EN 1899

PAR M. E. VIALA

Attaché au service antirabique.

I

Pendant l'année 1899, 1,614 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur : 10 sont mortes de la rage ; chez 4 d'elles, la mort est survenue moins de quinze jours après la fin du traitement¹. Deux personnes ont été prises de rage au cours du traitement, elles ne seront pas comptées parmi les traitées.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées.....	1,614
Morts.....	10
Mortalité 0/0.....	0,25

Dans le tableau suivant, ces chiffres se sont rapprochés de ceux fournis par les statistiques des années précédentes.

Années.	Personnes traitées.	Morts.	Mortalité 0/0.
1886.....	2671	25	0,94
1887.....	1770	14	0,79
1888.....	1622	9	0,55
1889.....	1830	7	0,38
1890.....	1540	5	0,32
1891.....	1359	4	0,25
1892.....	1790	4	0,22
1893.....	1648	6	0,36
1894.....	1387	7	0,50
1895.....	1520	5	0,33
1896.....	1308	4	0,30
1897.....	1521	6	0,39
1898.....	1465	3	0,20
1899.....	1614	10	0,25

1. D'après les expériences faites sur les chiens, on est autorisé à penser que les centres nerveux des personnes mortes de rage dans les 15 jours qui suivent le traitement ont été envahis par le virus rabique avant que la cure ait pu avoir toute son efficacité.

II

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories correspondant aux tableaux suivants :

Tableau A. — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Tableau B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Tableau C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Nous donnons ci-après la répartition, entre ces catégories, des personnes traitées en 1899.

	MORSURES A LA TÊTE			MORSURES AUX MAINS			MORSURES AUX MEMBRES			TOTAUX		
	Traités	Morts	Mortalité	Traités	Morts	Mortalité	Traités	Morts	Mortalité	Traités	Morts	Mortalité
Tableau A.	43	0	0	404	2	1,94	35	0	0	482	2	1,31
Tableau B.	442	1	0,70	664	0	0	293	1	0,34	1.099	2	0,18
Tableau C.	33	0	0	494	0	0	436	0	0	363	0	0
	488	1	0,53	962	2	0,20	464	1	0,23	1.614	4	0,25

III

Au point de vue de leur nationalité, les 1,614 personnes traitées se répartissent de la façon suivante :

Angleterre.....	42	Hollande.....	2
Belgique.....	43	Indes anglaises.....	62
Espagne.....	2	Maroc.....	1
Grèce.....	4	Suisse.....	7
Gibraltar.....	1	Turquie.....	2

Soit 108 étrangers et 1,506 Français.

Voici la répartition par départements des 1,506 Français. Il ne faut pas oublier, dans la comparaison avec les tableaux antérieurs, que quatre instituts antirabiques fonctionnent aujourd'hui qui n'existaient pas autrefois. Lille, Marseille, Montpellier. Lyon drainent les mordus de la région environnante.

Ain	32	Loire-Inférieure	2
Aisne	40	Loiret	3
Allier	8	Lot	20
Alpes (Basses-)	0	Lot-et-Garonne	32
Alpes (Hautes-)	0	Lozère	3
Alpes-Maritimes	1	Maine-et-Loire	8
Alger	0	Manche	3
Ardèche	2	Marne	2
Ardennes	0	Marne (Haute-)	0
Ariège	7	Mayenne	0
Aube	0	Meurthe-et-Moselle	3
Aude	0	Meuse	1
Aveyron	21	Morbihan	6
Bouches-du-Rhône	0	Nièvre	8
Calvados	5	Nord	1
Cantal	46	Oise	8
Charente	4	Oran	0
Charente-Inférieure	6	Orne	6
Cher	3	Pas-de-Calais	0
Constantine	0	Puy-de-Dôme	15
Corrèze	13	Pyrénées (Basses-)	19
Corse	0	Pyrénées (Hautes-)	12
Côte-d'Or	2	Pyrénées Orientales	1
Côtes-du-Nord	7	Rhin (Haut-)	0
Creuse	2	Rhône	236
Dordogne	16	Saône (Haute-)	0
Doubs	20	Saône-et-Loire	15
Drôme	3	Sarthe	16
Eure	6	Savoie	2
Eure-et-Loir	4	Savoie (Haute-)	0
Finistère	4	Seine	468
Gard	0	Seine-et-Marne	10
Garonne (Haute-)	18	Seine-et-Oise	82
Gers	21	Seine-Inférieure	18
Gironde	33	Sèvres (Deux-)	8
Hérault	0	Somme	15
Ille-et-Vilaine	23	Tarn	2
Indre	0	Tarn-et-Garonne	36
Indre-et-Loire	0	Var	0
Isère	40	Vaucluse	2
Jura	19	Vendée	6
Landes	13	Vienne	1
Loir-et-Cher	0	Vienne (Haute-)	0
Loire	51	Vosges	0
Loire (Haute-)	13	Yonne	2

Personnes prises de rage en cours de traitement.

TURPIN, Emile, 7 ans, chez ses parents, rue du Moutier, 70, à Aubervilliers, Seine. Mordu le 9 février, au nez, partie moyenne, deux morsures pénétrantes, et à la jambe gauche quatre autres morsures pénétrantes, par un chien reconnu enragé, du vivant de l'animal et à l'autopsie, par M. Coret, médecin-vétérinaire à Aubervilliers; ce chien avait mordu sept autres personnes qui ont subi le traitement antirabique et qui se portent bien.

Turpin a été traité à l'Institut Pasteur du 15 février au 3 mars : les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 3 mars; il est mort le 7 mars à l'Hôpital des Enfants.

MARTIN, Emile, 5 ans 1/2, chez ses parents, cultivateurs à Rozet-Fluant, Doubs. Mordu le 22 octobre, au front côté droit, trois morsures profondes qui ont beaucoup saigné, et aux deux paupières supérieures, deux autres morsures pénétrantes, par un chien déclaré enragé par M. Tondeur, vétérinaire à Dôle (Jura). Les blessures n'avaient pas été cautérisées.

Martin a été traité à l'Institut Pasteur du 27 octobre au 14 novembre : les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 14 novembre; il est mort le 18 novembre à l'Hôpital des Enfants.

Personnes traitées, mortes de la rage moins de 15 jours après la fin du traitement.

MESTRE, Aimé, 34 ans, marchand de vins, rue de Picpus, 126, Paris. Mordu le 7 juin, à l'avant-bras droit, trois morsures pénétrantes qui ont été cautérisées avec un liquide 3/4 d'heure après, bras nu, par son chien déclaré enragé par le vétérinaire de la fourrière.

Mestre a été traité à l'Institut Pasteur du 9 juin au 26 juin : les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 5 juillet, il est mort le 7 juillet.

MESTRE, Charles, 5 ans, fils de Mestre ci-dessus, rue de Picpus, 126. Mordu le 7 juin, par le même chien sur le sourcil droit, trois morsures pénétrantes, et en arrière de ces trois morsures et empiétant sur la région temporale, une autre morsure très profonde longue de 3 centimètres : ces blessures qui ont saigné beaucoup n'ont pas été cautérisées, elles ont été lavées seulement.

Traité à l'Institut Pasteur du 9 juin au 29 juin : les premiers symptômes rabiques se sont manifestés le 5 juillet; mort le 8 juillet.

THEVENET, Jean-Baptiste, 41 ans, chez ses parents, vigneron à Fleurie (Rhône). Mordu le 6 juillet, à la main droite, au niveau de la 3^e phalange de l'index, deux morsures pénétrantes, avec véritable perte de substance de 1 centimètre, par un chien dont M. le docteur Bec, de Fleurie, affirme la rage. Les blessures avaient été cautérisées à l'arnica 10 minutes après.

Le même chien a mordu deux autres personnes qui ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur et qui se portent bien.

Thevenet a été traité à l'Institut Pasteur du 9 au 26 juillet : les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 28 juillet; il est mort le 30 juillet.

CHOULOT, Berthe, 19 ans, cultivatrice à Parcey (Jura). Mordue le 30 août, sur l'aile droite du nez, une morsure pénétrante qui a saigné, par un chien errant, inconnu dans le pays, et qui a mordu un grand nombre de chiens et des porcs. M. Tondeur, vétérinaire à Dôle, nous écrit que deux des chiens mordus en même temps que M^{lle} Choulot sont devenus enragés, l'un le 7 septembre et l'autre le 8 octobre.

La morsure de M^{lle} Choulot n'a pas été cautérisée.

Traité à l'Institut Pasteur du 5 au 25 septembre, les premiers symp^{tes}

tômes rabiques se sont manifestés chez elle le 5 octobre, elle est morte le 7 octobre à l'hôpital de Dôle.

Personnes traitées, mortes de rage après le traitement.

LAPOUBLE, Jeanne, 10 ans, chez son père, charpentier à Cagnottes (Landes).

Mordue le 29 juillet, à la main droite, face dorsale, deux morsures pénétrantes qui ont saigné, par un chien déclaré après autopsie comme suspect de rage par M. Noguès, vétérinaire à Cagnotte.

(Nous avons su depuis qu'un âne mordu par ce même chien était devenu enragé le 26 septembre.)

Les blessures de la jeune Lapouble ont été lavées seulement à l'eau phéniquée 2 heures après.

Traitée à l'Institut Pasteur du 31 juillet au 14 août : les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez elle le 13 septembre, elle est morte le 17 septembre.

CHATEAU, Charles, 17 ans, porteur de dépêches, 13, rue du Chemin-Vert, au Parc-Saint-Maur (Seine). Mordu le 2 août à la jambe droite sous le jarret, quatre morsures qui ont saigné, le pantalon avait été déchiré par les dents du chien, qui a été reconnu enragé par un vétérinaire. Les blessures de Château n'avaient pas été cautérisées.

Château a été traité à l'Institut Pasteur du 4 au 19 août : les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui le 30 septembre, il est mort le 2 octobre.

GALARÉT, Louis, 39 ans, cultivateur à Senailiac (Lot). Mordu le 27 février, main droite, face dorsale, 6 morsures superficielles; index gauche, 6 autres morsures pénétrantes, et petit doigt gauche, 2 autres morsures pénétrantes, toutes ces morsures ont saigné.

Mordu par un chien dont la tête a été envoyée à l'Institut Pasteur, et dont le bulbe, inoculé le 2 mars à un cobaye, a donné la rage le 7 mai.

Les blessures de Galaret n'ont pas été cautérisées.

Galaret a été traité à l'Institut Pasteur du 2 au 21 mars : les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez lui dans le courant du mois d'octobre, il est mort vers le 15 octobre, nous n'avons pas eu de renseignements précis sur la date exacte de la mort.

OURLOUT, Louise, 49 ans, ouvrière en chaussures, demeurant à Paris, 7, petite rue des Lilas. Mordue le 13 octobre, à la joue droite, une morsure longue de 1 centimètre qui a saigné, par un chien reconnu enragé par M. Rondel, vétérinaire à Paris. La blessure de Mme Ourlout n'avait pas été cautérisée.

Elle a été traitée à l'Institut Pasteur du 20 octobre au 10 novembre. Les premiers symptômes rabiques se sont manifestés chez elle le 2 décembre : elle est morte le 3 à l'hôpital Tenon.

REVUES ET ANALYSES

GLOBULOLYSE ET PRESSION OSMOTIQUE

PAR LE DR P. NOLF

REVUE GÉNÉRALE

Les auteurs qui ont étudié la destruction des bactéries dans le sérum des animaux supérieurs ou celle des globules rouges d'une espèce animale dans le sérum d'autres espèces, ont généralement vu dans ces phénomènes des faits de digestion, analogues à celle d'un flocon de fibrine dans une solution de pepsine. En faveur d'une pareille assimilation plaidaient la nature albuminoïde des globules, des bactéries, et l'acte même de leur dissolution, au moins partielle, dans le liquide actif.

D'autre part, les quelques propriétés connues des alexines, leur fragilité si grande vis-à-vis des agents chimiques et physiques, l'action favorisante d'une température de 37° sur les phénomènes de dissolution qu'elles provoquent, les rapprochent aussi des enzymes. Ce rapprochement était d'autant plus facile à prévoir que l'idée que nous nous faisons d'un ferment soluble étant encore très peu précise, nous avons une tendance naturelle à classer, sous la rubrique fermentation, tout phénomène chimique, d'une durée assez longue, où interviennent des albuminoïdes.

Il est très probable cependant que, sous cette étiquette, sont catalogués actuellement des phénomènes d'essence très différente, et dont le seul caractère commun est notre absolue ignorance de ce qui les constitue. Ces comparaisons, où le terme auquel on compare, n'est guère plus connu que le terme comparé, ont donc pour unique résultat de décorer d'un nom le phénomène qu'il s'agirait d'expliquer. Il serait bien plus profitable de chercher, quand cela est possible, des points de comparaison dans des phénomènes plus simples, où des faits analogues se produisent sous l'influence d'agents dont nous connaissons les propriétés. Et dans la question des dissolutions de globules ou de microbes par les sérums, je ne doute en aucune manière que, quelle

que soit d'ailleurs l'essence du phénomène, nous n'ayons plus d'avantage actuellement à le comparer à ce qui se passe, quand la même dissolution se produit sous l'action de l'eau distillée, qu'à l'assimiler à la digestion d'un fragment d'albumine solide dans un ferment peptonisant. Et cela d'autant plus, que les produits de destruction du globule par l'eau ou par l'alexine sont les mêmes : hémoglobine diffusée et stroma résiduel, et que ni l'hémoglobine, ni le stroma ne semblent subir de modification ultérieure. Qu'est-ce alors que cette action fermentative, dont le résultat est la destruction non d'une combinaison chimique, mais d'un simple équilibre osmotique, rompu plus rapidement et plus complètement par l'eau que par le sérum ?

Cette manière d'envisager la question n'est cependant pas celle qui est généralement en honneur. Peut-être faut-il incriminer notre manque de connaissances en ce qui concerne la bactériolyse par les corps chimiques. Il ne peut cependant en être de même pour les globules rouges, qui sont le matériel de choix, dont se sont servis les physiologistes dans leurs expériences sur l'action dissolvante d'un grand nombre de solutions. Comme les résultats des travaux de ces dernières années sur ce sujet sont en complète concordance entre eux et que leur point de vue est totalement différent des opinions admises en bactériologie, j'ai cru utile de rapporter ici leurs données essentielles. Mais qu'il me soit permis, avant de commencer cet exposé, de rappeler quelques notions fondamentales au sujet des pressions osmotiques.

L'étude de ces dernières date de la découverte des cloisons semi-perméables. On connaissait depuis Graham des cloisons (tel le parchemin) qui laissaient passer certaines substances dissoutes à l'exclusion d'autres : celles qui passaient étaient dites cristalloïdes, les autres colloïdes. Traube, et ensuite Pfeffer décrivirent des cloisons qui ne se laissaient plus traverser par la plupart des substances que l'eau dissout, tandis que l'eau même passe librement. Vis-à-vis de pareilles membranes, dites semi-perméables, beaucoup de sels seraient des colloïdes. Or, si dans un vase, dont la paroi est constituée par une de ces cloisons semi-perméables, on verse une solution d'une substance ne passant pas, qu'on adapte sur le vase, fermé hermétiquement, un manomètre et qu'on plonge le tout dans l'eau distillée, le manomètre indiquera bientôt une hausse de la pression intérieure du vase, hausse qui peut devenir énorme. Cette élévation de pression mesure la tension osmotique de la solution qui remplit le vase.

L'expérience démontre que la pression osmotique est proportionnelle au nombre de molécules du corps dissous dans un volume donné de liquide, et les lois qui la régissent sont, comme l'a démontré van t'Hoff, identiques à celles qui mesurent la pression des gaz. C'est ce qui a amené van t'Hoff à concevoir l'acte de la solution comme étant

l'évaporation du corps dissous dans un volume donné de liquide. Quand un morceau de sucre fond dans l'eau, les choses se passent comme si les molécules de sucre, subitement libérées de leurs attaches mutuelles, s'élançaient, à la façon de vraies molécules gazeuses, dans l'espace libre qui leur est offert (l'espace du dissolvant), pour le parcourir dans tous les sens et venir exercer par leurs chocs contre l'enveloppe du dissolvant une véritable pression, qui est la pression osmotique. S'il existe un excès de sucre pour la quantité d'eau qui surnage, il se produit bientôt un équilibre correspondant à la saturation du liquide. Cette saturation est l'analogie de la tension de vapeur maxima que donne un liquide qui s'évapore en partie dans un espace vide limité.

D'après cette théorie, toutes les molécules étant équivalentes au point de vue de la pression qu'elles exercent, les solutions équimoléculaires doivent posséder la même tension osmotique et cette tension doit être égale à la pression exercée par un même nombre de molécules gazeuses occupant le même volume. Or 1 gramme-molécule d'un gaz quelconque occupe à 0° l'espace de 22,4 litres, ou se trouve enfermé à la même température sous une pression de 22,4 atmosphères dans le volume de 1 litre. Cette pression doit donc être celle qu'exercent 342 grammes (poids moléculaire) de sucre dans un litre de solution, d'où, pour une concentration de 1 0/0 de sucre, une pression de 0,655 atmosphères à 0°, et, à 15°, de 0,655 $(1 + 15 \alpha) = 0,69$ atmosphères. Les mesures directes de Pfeffer à cette température donnèrent des valeurs oscillant entre 0,62 et 0,71.

Des valeurs concordant aussi parfaitement furent trouvées pour une série de substances. D'autres au contraire (et ce sont, comme le fit remarquer Arrhenius, celles dont les solutions conduisent l'électricité) possèdent un pouvoir osmotique supérieur à celui exigé par la théorie. C'est ce qui a amené Arrhenius à reprendre une hypothèse de Clausius, d'après laquelle les molécules des substances conduisant l'électricité en solution aqueuse (électrolytes) étaient en partie dissociées dans la solution. La dissociation aurait pour effet de diviser la molécule en deux ou plusieurs parties appelées *ions*, qui sont des atomes ou des groupes atomiques pourvus d'une charge électrique. Or, d'après Arrhenius, au point de vue de leur valeur osmotique, molécule et ion sont équivalents, et l'on conçoit que si de m molécules, n sont dissociées chacune en deux ions, la pression au lieu d'être proportionnelle à m , le sera à $m + n$ et si le nombre d'ions fournis par une molécule est de 3, 4, le coefficient osmotique deviendra $m + 2n$, $m + 3n$, etc.

Au lieu d'employer, pour la mesure de la pression osmotique, le moyen direct consistant en l'emploi d'un vase à paroi semi-perméable muni d'un manomètre, il est plus simple de déterminer certaines cons-

tantes physiques, telles que la température de congélation de la solution ou son point d'ébullition. L'expérience, conformément aux vues théoriques, a démontré, en effet, qu'il existe entre la valeur de la pression osmotique d'une solution et l'abaissement ou l'élévation de ses températures de congélation ou d'ébullition comparées à celles du dissolvant, des rapports simples permettant de calculer facilement l'une de ces valeurs au moyen des autres.

Ces données, qui ont révolutionné la chimie des solutions, sont destinées à jouer en biologie un rôle toujours plus important, puisque tous les phénomènes de la vie se passent au sein de liquides.

Leur première application à la physiologie des animaux date des travaux de Hamburger. Hamburger fut précédé par un botaniste, son compatriote H. de Vries, qui étudia l'action des solutions salines sur les cellules végétales.

Quand on place dans une solution saline concentrée, mais non vénéneuse pour le protoplasme végétal, quelques cellules épidermiques de la nervure médiane d'une feuille de *Tradescantia discolor*, on voit la couche protoplasmique corticale des cellules se détacher de la paroi cellulosique des logettes qui les contiennent; le corps protoplasmique, ramassé en boule, n'occupant plus qu'une partie de l'espace de ces dernières. Ce phénomène, connu de Naegeli, s'appelait *plasmolyse* des cellules. Si l'on plonge maintenant les cellules plasmolysées dans l'eau pure, elles gonflent rapidement et viennent de nouveau remplir complètement leur logette. Elles sont alors en *turgescence*.

Ce retrait sous l'action de solutions concentrées, cette turgescence dans l'eau pure, se comprennent facilement, si l'on admet que la paroi protoplasmique de la cellule végétale est imperméable pour les sels dissous dans l'eau, perméable au contraire à celle-ci, en un mot, si elle constitue une membrane semi perméable. D'après les lois de l'osmose, il faut, dans ces conditions, qu'il y ait un courant d'eau à travers la paroi cellulaire, allant de l'endroit où règne la tension osmotique la plus élevée, vers l'endroit de moindre tension. Les liquides contenus à l'intérieur des cellules épidermiques possèdent une pression osmotique bien déterminée, due aux substances qu'ils tiennent en solution. Vient-on à plonger un lambeau épidermique dans une solution saline ou sucrée concentrée, à tension osmotique très élevée, il s'établit aussitôt un courant d'eau de la cellule vers l'extérieur; la cellule perd son eau d'imbibition, elle se ratatine et le phénomène ne s'arrête que lorsque la pression osmotique dans le liquide intra-cellulaire est devenue égale à celle de la solution qui la baigne. C'est ce qui a lieu, quand les deux liquides ont une même concentration moléculaire. Placée au contraire dans l'eau distillée, où la tension osmotique est nulle, la cellule plasmolysée gonfle, parce qu'il s'établit immédia-

tement un courant entraînant l'eau de l'extérieur vers l'intérieur, et comme ici encore le phénomène ne s'arrête que lorsque l'équilibre est établi, la cellule devrait tendre vers un volume infiniment grand. Seulement elle est heureusement bornée dans son expansion par la logette de cellulose qui l'emprisonne, car si nul obstacle ne l'arrêtait, elle éclaterait infailliblement sous la poussée interne qui la distend.

H. de Vries ayant déterminé, pour différents sels, la concentration minima de leurs solutions aqueuses, provoquant encore un début de plasmolyse des cellules de *Tradescantia discolor*, trouva que pour des sels de même constitution chimique, tels que KNO_3 , KBr , KCl , NaCl , NaI , etc., cette concentration correspond d'un sel à l'autre à une même teneur en molécules. D'autre part, du fait qu'à cette concentration correspondait la limite inférieure du pouvoir plasmolysant de ces sels, il était en droit de conclure que pour cette teneur en molécules, les solutions des sels précédents possédaient une pression osmotique approximativement égale (très légèrement supérieure) à celle du liquide contenu dans les vacuoles de la cellule. Pour ce motif, de Vries appela ces solutions, des solutions *isotoniques* entre elles et avec le liquide cellulaire. D'autres sels, tels que l'oxalate, le sulfate de potassium, le phosphate bipotassique se montraient également isotoniques entre eux pour des concentrations moléculaires égales, mais la tension d'une solution de l'un d'eux, comparée à celle d'une solution équimoléculaire d'un sel de la première série, était plus élevée dans le rapport de 4 à 3.

Ayant déterminé la valeur osmotique de la molécule d'un grand nombre de substances et ayant comparé les résultats entre eux, de Vries reconnut que les corps chimiques examinés se réunissaient en groupes de *même pouvoir osmotique moléculaire*, et que, d'un groupe à l'autre, les valeurs moyennes se trouvaient dans des rapports simples. Ce pouvoir osmotique moléculaire, qu'il appela *coefficient isotonique*, étant fait égal à 2 pour le sucre de raisin, celui des sels alcalins des acides monobasiques était 3, celui des sels alcalins des acides bibasiques, 4, etc.

Quand Hamburger¹ voulut étudier au même point de vue l'action des solutions salines sur les globules rouges du sang, il dut naturellement renoncer au phénomène-limite, qui avait servi à de Vries, la rétraction cellulaire amenant le décollement entre protoplasme pariétal et cloison cellulosique. Les globules rouges étant des cellules nues, dépourvues de toute coque rigide, un pareil phénomène ne peut se produire. Quand un globule est plongé dans une solution de pouvoir osmotique supérieur au sien propre (solution hyperisotonique), il se ratatine, en expulsant une partie de son eau d'imbibition. Il prend alors l'aspect de boule épineuse, familier aux cliniciens qui le rencontrent dans les urines sanglantes un peu concentrées. Est-il placé au contraire

dans une solution à tension osmotique plus faible que la sienne (solution hypotonique), le courant d'eau s'établira de l'extérieur vers l'intérieur et le globule gonflera. Il le fera librement, puisque aucune membrane ne l'enserme, et la dilatation ne s'arrêtera que lorsque l'équilibre sera atteint. Mais l'élasticité de la couche protoplasmique pariétale est limitée. On comprend dès lors que, si la tension extérieure est très faible ou nulle (eau distillée), le gonflement globulaire deviendra tel à un moment donné, qu'il y aura éclatement total ou partiel de la paroi globulaire, et le contenu coloré de l'hématie passera dans le liquide ambiant. C'est ce phénomène qui servit à Hamburger de réaction-limite.

Il ajouta de petites quantités du sang de divers animaux à des solutions différemment concentrées de nombreux sels, tels que le nitrate, l'iodure, le bromure, l'acétate, l'oxalate de potassium, le chlorure, le bromure, l'iodure de sodium, le chlorure, les sulfates de magnésium anhydre et hydraté, les chlorures de calcium, de baryum et aussi le sucre de canne. Et il détermina pour chacune de ces substances quelle était la concentration correspondant à un début d'hémolyse.

Hamburger s'adressait à des cellules d'origine et de signification complètement différentes de celles qu'avait observées de Vries, il prenait comme réaction limite un phénomène en apparence absolument distinct, et pourtant les résultats, auxquels il aboutit, furent la reproduction fidèle de ceux de son prédécesseur. A part quelques différences de détail, la concordance était mathématique. Ici encore les substances examinées se montrèrent actives, non en raison de leurs propriétés chimiques, mais en raison de leur concentration moléculaire. Des solutions équimoléculaires de NaCl , NaI , NaBr , KNO_3 , etc., agissaient identiquement de même sur les globules. Ici encore se retrouvaient les différences du coefficient isotonique d'un groupe de substances chimiques à l'autre, et les valeurs trouvées étaient celles de de Vries.

Hamburger confirmait ainsi d'une façon éclatante en physiologie animale les résultats acquis en botanique, et montrait la grande portée des phénomènes osmotiques en biologie.

Ayant déterminé, pour le sang de mammifère, la valeur osmotique d'une solution de nitrate de potassium immédiatement supérieure à celle qui détermine un début de globulolyse, Hamburger fit les mêmes mesures pour les globules de sang de poule, de grenouille et de tanche. Soit 1 la valeur osmotique de la solution correspondant au sang de mammifère; pour les oiseaux, elle sera 0,741; pour la tanche, 0,669; pour la grenouille, 0,302.

Cependant ces chiffres n'expriment pas la tension osmotique vraie de l'intérieur du globule, elles donnent la valeur de la tension limite que le globule est capable de supporter sans perdre son hémoglobine. Il fallait donc, pour évaluer la tension osmotique normale du globule,

recourir à un autre procédé. Hamburger ² s'adressa d'abord à l'examen microscopique, qui décèle les variations d'aspect des globules dans les solutions hyper- ou hypotoniques. Mais la méthode était peu rigoureuse, les résultats manquaient de netteté.

En même temps, il proposa le moyen indirect consistant à déterminer la quantité d'eau qu'il fallait ajouter à du sérum, pour que celui-ci provoquât un commencement de globulolyse. Pour le sérum de grenouille, il fallait l'addition de 2,5 volumes d'eau à un volume de sérum. Or la solution de NaCl dans laquelle les globules rouges de grenouille commencent à perdre leur hémoglobine étant de 0,21 0/0, on était en droit de dire que le sérum de grenouille avait une tension équivalente à celle d'une solution de chlorure sodique de $\frac{0,21 \times 35}{10} = 0,73$ 0/0. L'examen microscopique lui assignait le titre 0,64 0/0. Par le même procédé, Hamburger arrivait, pour le sérum de bœuf, à une valeur osmotique correspondant à celle d'une solution de chlorure sodique de 1,12 0/0. Il est inutile de dire que cette mesure de la valeur osmotique du sérum du sang donnait également celle des globules, les deux étant forcément égales.

En 1890 ³, la même méthode lui fournissait pour le sérum de cheval une valeur correspondant à celle d'une solution de sucre de canne de 0,71 0/0, ce qui équivalait en NaCl à 0,82 0/0. Ce résultat, assez différent du précédent, n'était pas définitif. Toujours par le même procédé, le même auteur arrivait ⁴, en 1893, à une valeur de 0,92 0/0 de NaCl pour la pression osmotique du sérum de bœuf. Il existe d'ailleurs des variations assez considérables de celle-ci à l'état normal. En même temps, Hamburger contrôlait par deux autres méthodes les chiffres que lui avait fournis son procédé.

Il répéta d'abord les déterminations, faites en premier lieu par Dreser, du point de congélation du sérum sanguin, d'où l'on tire par le calcul la valeur de sa pression osmotique. La concordance entre les résultats des deux méthodes fut complète. Ensuite il se servit également d'un procédé, proposé par Blix et Hedin en vue d'autres recherches.

Hedin ⁵ avait employé en 1891 la force centrifuge comme moyen de détermination du volume total des globules rouges d'un sang donné. Il mélangeait le sang à examiner avec un égal volume de liquide de Müller, introduisait le mélange dans des pipettes calibrées, formées d'un tube de verre à paroi épaisse, à lumière étroite, ouvert aux deux bouts. Après introduction du sang par aspiration, les pipettes étaient bouchées au moyen de plaques de caoutchouc et soumises à l'action de la force centrifuge, jusqu'à ce que le volume occupé par les globules fût devenu invariable. Dans ces conditions, le sang à l'état normal donne

un volume globulaire sensiblement constant d'un échantillon à l'autre. La même méthode, appliquée à du sang d'origine pathologique, devait servir, dans l'idée de son inventeur, à la détermination des volumes relatifs de la masse globulaire dans les différents états morbides.

A ce moment, Hedin n'avait eu en aucune manière l'idée d'employer sa méthode à la mesure des pressions osmotiques. Ce fut Hamburger qui lui donna cette destination. Ayant été conduit par ses études antérieures à observer les changements considérables de volume que subissent les globules rouges sous l'influence de solutions salines de concentrations diverses, il eut l'idée, au lieu de mesurer individuellement les globules, de déterminer les variations de leur masse dans ces diverses solutions. Pour cela, il reprit la méthode de Hedin, celle de l'hématocrite. Ayant ainsi soumis à la force centrifuge des mélanges de globules dans diverses solutions salines ou sucrées, il constata que pour des liqueurs isotoniques de nature chimique diverse, le volume globulaire est constant, et que d'autre part pour une même substance, le volume globulaire est en raison inverse de la concentration de la solution. Cette nouvelle confirmation était d'autant plus intéressante qu'elle gardait intacts les globules sur lesquels on opère.

Ce fut la même méthode dont se servit exclusivement Hedin, quand il reprit en 1894 ses études sur les volumes globulaires, en se plaçant cette fois-ci au point de vue de la tension osmotique. Ses recherches confirmèrent complètement les résultats de Hamburger et les complétèrent. Hedin fut le premier qui attira l'attention sur la nature des coefficients isotoniques de de Vries et de Hamburger.

Il démontra que ces différentes valeurs de la tension osmotique moléculaire étaient dues à la dissociation partielle des molécules en ions, dissociation très forte pour les sels alcalins et alcalino-terreux aux concentrations employées. Or, comme il a été dit, suivant que le nombre d'atomes contenu dans une molécule sera plus ou moins grand, cette dissociation augmentera la tension osmotique dans une proportion plus ou moins forte, et c'est ce qui explique que de Vries et Hamburger, en groupant les sels étudiés suivant leur coefficient isotonique, étaient arrivés à les grouper non d'après leurs propriétés chimiques, mais d'après la valence du métal ou de l'acide.

En étudiant à ce point de vue les coefficients isotoniques trouvés par ses devanciers et ses résultats propres, Hedin put déterminer, par une méthode physiologique, la valeur du coefficient de dissociation pour différents sels, et les chiffres trouvés concordaient en tous points avec ceux établis par différents physiciens, qui les avaient tirés de recherches sur la conductibilité électrique.

Koeppé arrivait d'une façon complètement indépendante aux

mêmes conclusions en 1895, par la méthode de l'hématocrite ⁷.

D'autres auteurs encore, en s'occupant des mêmes questions ou de sujets attenants, purent confirmer ces faits, et, depuis, aucune voix discordante ne s'est élevée. On peut donc considérer comme un fait acquis que l'action conservatrice ou destructive des solutions salines citées précédemment, découle de leurs propriétés osmotiques, et que la globulolyse qu'elles provoquent, quand elles sont trop diluées, est un phénomène d'ordre exclusivement physique.

Or, à côté de ces substances qui ne deviennent nocives pour les globules rouges que grâce à une concentration trop faible, les physiologistes en connaissaient depuis longtemps d'autres, telles que l'urée, la glycérine, l'éther, le chloroforme, certains sels ammoniacaux, etc., qui détruisent les globules en toutes concentrations, en vertu d'une action qu'on appelait vénéneuse, faute de l'expliquer. Il était du plus haut intérêt de reprendre leur étude à la lumière des travaux précités et de tâcher d'élucider l'essence de cette toxicité. C'est ce qu'entreprit Gryns.

Quelques auteurs avaient déjà constaté que l'action de plusieurs de ces substances vénéneuses pour les globules rouges était empêchée par la présence simultanée de sels non nocifs. C'est ainsi que Hamburger avait trouvé que des quantités suffisantes de nitrate potassique empêchaient l'action dissolvante du chlorure ammonique. Mais aucune explication n'avait été donnée de ce phénomène. Gryns montra d'abord que l'urée provoque la globulolyse en toute concentration. Si à une solution d'urée on ajoute du chlorure sodique en quantité suffisante pour que ce sel possède une tension osmotique égale à celle du sérum, la solution perd toute action nocive sur les globules. Le sel marin n'y agit pas du tout comme antidote spécifique, il peut être remplacé par des quantités *équivalentes au point de vue osmotique* de sucre de canne ou d'un autre sel de potassium ou de sodium. Si, d'autre part, on fait deux séries de dilutions successives d'une solution isotonique de chlorure sodique, en employant dans la première série de l'eau distillée, dans la seconde une solution d'urée, et qu'on ajoute des globules rouges à ces diverses liqueurs, la limite de la globulolyse est exactement la même dans les deux séries. On en arrive ainsi à la conclusion que les solutions d'urée agissent sur les globules rouges à la façon de l'eau distillée pure, et ne sont donc pas un vrai poison protoplasmique. Au point de vue osmotique, on peut concevoir très aisément le phénomène, en admettant que l'enveloppe des globules rouges est perméable à l'urée comme à l'eau. S'il est vrai que les molécules d'urée traversent l'enveloppe du coefficient aussi rapidement que l'eau, la solution d'urée pure pourra posséder n'importe quelle tension osmotique, celle-ci n'existera pas pour le globule qui

s'y comportera comme dans l'eau distillée. La preuve directe de la pénétration de l'urée à l'intérieur des globules n'était pas difficile à faire. Des globules furent mis en suspension dans une solution isotonique de chlorure sodique contenant 10 0/0 d'urée et soumis à la centrifugation. Un dosage d'urée dans le liquide surnageant et dans le dépôt globulaire indiqua la même teneur, ce qui ne se comprend qu'en admettant une répartition égale de l'urée entre le liquide surnageant et les globules. L'auteur put constater de même une pénétration du chlorure ammonique dans les globules.

En employant la même méthode, c'est-à-dire en faisant agir sur les globules, les solutions des diverses substances étudiées dans l'eau pure et dans une solution isotonique de chlorure sodique, Gryns admit (sans plus faire d'analyse directe du liquide et des globules) que toute substance qui dissout les globules en solution aqueuse et est inactive en solution chlorurée, est une substance pénétrante. Au contraire, si la solution aqueuse en concentration isotonique ne provoque pas de globulolyse ou ne la provoque que tardivement et que le chlorure sodique ne l'influence pas, la substance n'est pas pénétrante.

Parmi les résultats les plus intéressants de cette recherche, il faut citer les suivants :

Ayant constaté que la plupart des sels d'ammonium, tels que le chlorure, le bromure, etc., pénètrent les globules, tandis que les sels de potassium ou de sodium des mêmes acides n'entrent pas, Gryns cherche l'explication de ce fait dans l'hypothèse suivante. En solution aqueuse diluée, tous ces sels sont dissociés en leurs ions. Il faut donc, pour que l'un d'eux traverse la paroi globulaire, que celle-ci soit perméable non à sa molécule complète, mais à ses deux ions envisagés isolément. Si deux ions ne pénètrent ni l'un ni l'autre, il n'y aura évidemment pas pénétration de la molécule à laquelle ils appartiennent. Si l'un des deux pénètre à l'exclusion de l'autre, il y aura en réalité pénétration de quelques ions dans les globules, mais en raison de la charge électrique considérable des ions qui ont pénétré, la solution prend une charge électrique de nom contraire, assez forte pour arrêter toute pénétration ultérieure, à un moment où la quantité des ions passés est encore de beaucoup trop faible pour pouvoir être mesurée par pesée. Si donc un ion pénétrant est accouplé dans une molécule à un ion qui ne franchit pas la paroi globulaire, l'action nocive du premier sera empêchée par le second. D'après Gryns, parmi les ions électro-positifs, H^+ , N^+ est pénétrant à l'encontre de K^+ , Na^+ ; parmi les électro-négatifs Cl^- , Br^- , I^- , etc., sont pénétrants, tandis que SO_4^- , NO_3^- ne le sont pas. Cette explication n'est que l'application biologique d'une hypothèse formulée par Ostwald au sujet de la membrane semi-perméable de ferro-cyanure de cuivre. Celle-ci laisse passer le

chlorure de potassium, mais retient le chlorure de baryum et le sulfate de potassium, ce qu'Ostwald explique en déclarant la membrane perméable aux ions K^+ , Cl^- , imperméable aux ions Ba^+ , SO_4^- . Gryns n'envisage que les ions et ne se préoccupe pas des molécules neutres non dissociées qui coexistent en petit nombre à leurs côtés dans les solutions.

En ce qui concerne les solutions très diluées des sels alcalins, où la dissociation en ions est pour ainsi dire complète, il est clair que les propriétés pénétrantes ou non pénétrantes d'un sel doivent être moins fonction de sa molécule que de ses ions. Il en est tout autrement quand la solution saline devient plus concentrée, et, dans le cas du $Am_2 SO_4$, par exemple, il y aurait à considérer, pour une certaine concentration de solution, non plus seulement les ions Am^+ et SO_4^- , mais encore les molécules non dissociées $Am_2 SO_4$, dont les propriétés de pénétration sont totalement indépendantes de celles des ions.

Et pour certaines substances dissociées, on ne peut pas *a priori* rejeter l'influence possible de ce troisième élément, même en solution diluée. Que la question ne se limite pas aussi simplement que l'indique l'énoncé de Gryns, c'est d'ailleurs prouvé par le fait que le sulfate ammonique, bien que possédant un ion non pénétrant SO_4^- , provoque cependant à la longue de la globulolyse. Il en est de même de $Na_2 CO_3$, dans lequel Na^+ est non pénétrant, CO_3^- pénétrant. Pourquoi $Na_2 CO_3$ produit-il, tardivement il est vrai, une destruction des globules, alors que $NaCl$ ne les altère aucunement? C'est ce que n'expliquent pas jusqu'ici les propriétés des ions. Il faut donc faire ici la part d'autres facteurs, dont la nature et le mode d'action sont encore à déterminer.

En ce qui concerne les substances non dissociées, les alcools mono et triatomiques (glycérine) traversent facilement la paroi globulaire, l'érythrite (alcool tétratomique) y réussit encore, mais lentement, et la mannite (alcool hexatomique) ne le fait plus du tout. Les globules sont perméables aux éthers, aux acides gras et à leurs amides, non aux acides aminés ni aux sucres.

Ces résultats sont extrêmement intéressants à nombre de points de vue. Tout d'abord, ils ramènent à une pure question de physique l'action vénéneuse d'un grand nombre des anciens poisons des globules rouges, et sous ce rapport, ils ouvrent la voie à des recherches similaires en toxicologie, où les conceptions générales ont eu jusqu'aujourd'hui leur source principale dans des considérations tirées de la statique chimique.

D'autre part, comme le fait remarquer Gryns, ils nous montrent que c'est à tort que dans les études physiologiques si nombreuses actuellement, où les questions d'absorption intestinale, de sécrétion rénale, de formation de lymph, sont étudiées au point de vue des lois

de l'osmose, on considère comme osmotiquement active la masse totale des substances dissoutes dans le liquide examiné. Supposons la paroi intestinale perméable au chlorure sodique. Dans ces conditions, une solution isotonique de ce corps se comportera dans l'intestin comme de l'eau pure. Vis-à-vis d'elle, le plasma sanguin se comportera, non en raison de son pouvoir osmotique absolu, qui est dû en bonne partie à sa teneur en chlorure sodique, mais en raison de la fraction de sa tension osmotique due à des constituants, pour lesquels la paroi intestinale est imperméable. Cette fraction seule sera active, c'est elle seule qui provoquera l'absorption du chlorure sodique. Il en serait encore ainsi même dans le cas, où la solution de NaCl introduite dans le tube digestif aurait une tension osmotique supérieure à celle du plasma.

Comme il a été dit, Gryns avait été amené, dans ses essais sur les sels alcalins, à faire intervenir la dissociation électrolytique. pour expliquer les propriétés différentes des divers sels d'ammonium. D'après lui, les sels d'ammonium pénétrants doivent être considérés comme formés de deux ions pénétrants, les non pénétrants sont les sels d'ammonium des acides dont l'ion électro-négatif ne pénètre pas. Une hypothèse semblable avait déjà été mise en avant par Koeppé pour expliquer la sécrétion de l'acide chlorhydrique de l'estomac. Le même auteur étudia au même point de vue quelques particularités intéressantes de l'action des sels alcalins sur les globules rouges.

De ses précédentes recherches au moyen de l'hématocrite, Koeppé avait tiré pour le coefficient de dissociation du chlorure sodique en concentration isotonique, une valeur $i = 1,6$ alors que les recherches de Raoult et d'Arrhenius lui assignent la valeur $i = 1,9$. Pour le carbonate de soude, l'hématocrite avait donné $i = 2,68$, tandis que les mêmes physiciens fixent $i = 2,18$. La méthode physiologique donnait donc une valeur trop faible dans le premier cas, trop forte dans le second.

Une expérience de Gürber, qu'il répéta en la variant quelque peu, lui fournit l'explication du désaccord. Quand on lave les globules rouges avec une solution isotonique de sucre, jusqu'à les débarrasser des dernières traces du sérum qui les mouillait, qu'on sature la bouillie corpusculaire d'anhydride carbonique, puis qu'on la met en suspension dans une solution isotonique de chlorure sodique, celle-ci devient alcaline et perd une certaine quantité de son chlore. Le même résultat s'obtient si l'on emploie du KCl, tandis que le résultat est négatif avec du sulfate de soude ou de potasse. Des globules artérialisés par l'agitation à l'air n'influencent nullement l'alcalinité de la solution. Gürber avait déjà prouvé par des dosages directs, que l'alcalinisation n'était pas due à une sortie d'alcali hors des globules, comme l'avait cru Zuntz. Koeppé explique le fait par des passages d'ions en quantité équivalente à travers la paroi globulaire.

Prenons le cas des globules veineux dans une solution de chlorure de potassium. Il s'établit immédiatement entre les hématies et le liquide extérieur un échange d'eau qui a pour effet de réaliser pour ainsi dire instantanément l'égalité de la pression osmotique dans les globules et autour d'eux. Or, dans le liquide extérieur cette pression est uniquement fonction de KCl ; à l'intérieur, elle dépend de KCl , de K_2CO_3 et d'autres substances dissoutes dans le suc cellulaire, la somme de ces tensions partielles étant égale à la pression du chlorure potassique extra-globulaire. Il y a donc hors du globule une tension partielle de Cl^- beaucoup plus forte que dans le globule, ou par contre la tension de CO_3^{--} est considérable, alors qu'elle est nulle au dehors. Or, la paroi globulaire est perméable, comme on l'a vu, à CO_3^{--} et à Cl^- , imperméable à K . Il a été dit également plus haut que, lorsque des deux ions d'une molécule dissociée, un seul peut passer, il en est empêché par l'autre, dont la charge électrique le retient. Mais dans le cas présent, l'obstacle est levé, puisque, au fur et à mesure que des ions Cl pénètrent dans le globule, ils sont remplacés dans le liquide ambiant par des ions CO_3 qui ont une charge électrique de même nom. Une partie du KCl extérieur sera donc bientôt remplacé par du K_2CO_3 , ce qui déterminera l'alcalinité du liquide.

Si au lieu de KCl , il y avait du K_2SO_4 dans le liquide extérieur, l'échange ne pourrait avoir lieu puisque l'ion SO_4^{--} ne traverse pas la paroi globulaire.

Cette façon d'envisager les choses est extrêmement intéressante et il semble que l'explication rende compte de toutes les données de l'expérience.

D'autre part, si CO_3 est équivalent au point de vue de sa charge électrique à 2Cl , il n'en est pas de même au point de vue de la pression osmotique, où 4CO_3 et 4Cl sont équivalents. C'est ce qui explique, d'après Koeppé, que les valeurs trouvées pour l'équivalent osmotique ou le coefficient de dissociation de NaCl , KCl sont trop faibles, trop fortes au contraire pour Na_2CO_3 , K_2CO_3 , absolument exactes pour Na_2SO_4 , K_2SO_4 .

Comme on le voit, Koeppé admet une imperméabilité absolue de la paroi globulaire vis-à-vis des ions des métaux alcalins K et Na , et limite aux ions électro-négatifs les échanges opérés entre globules et milieu extérieur.

L'absorption du chlore du sérum par les globules sous l'influence de CO_2 avait déjà été démontrée par Hamburger ¹⁰, mais cet auteur ne tenant pas compte des phénomènes de dissociation, avait admis un échange des *molécules* du sérum au globule, échange qu'il supposait équivalent au point de vue osmotique.

Cette question si intéressante de la pénétration soit d'ion soit des

molécules dans les globules, fut traitée d'une façon approfondie dans un mémoire très important de Hedin ¹¹.

La méthode employée par cet auteur repose sur le principe suivant.

Prenons un volume de sang S et le même volume P du plasma de ce sang; à l'un et l'autre ajoutons la même quantité de la substance dont il s'agit de déterminer le pouvoir pénétrant dans les globules. Déterminons actuellement la valeur de la pression osmotique, ou, ce qui revient au même, l'abaissement du point de congélation après centrifugation dans le plasma de S, et dans P. Soit a , le chiffre correspondant à S, soit b celui correspondant à P. Trois cas peuvent se présenter : $a > b$ ou $\frac{a}{b} > 1$, ce qui indiquera que la substance ajoutée au sang est restée en grande partie ou en totalité dans le plasma; $a = b$ ou $\frac{a}{b} = 1$, signifiant que le partage dans le sang s'est fait uniformément entre globules et plasma; $a < b$ ou $\frac{a}{b} < 1$, quand la substance dissoute se concentre à l'intérieur des globules.

En réalité, la méthode est un peu plus compliquée. La dissolution de la substance dans le sang doit se faire moyennant certaines précautions en vue d'éviter la détérioration des globules; quand la substance étudiée est globulicide, il faut neutraliser son action par l'adjonction de corps neutralisant l'effet nocif. Il faut encore tenir compte de l'action dilatante ou rétrécissante de la substance sur les globules, et aussi de la quantité absolue de ceux-ci dans le sang normal.

D'autre part, en raison des hypothèses faites par différents auteurs sur des échanges possibles, soit de molécules, soit d'ions entre les globules et le liquide qui les baigne, il fallait s'assurer, si, dans le cours des expériences, pareils échanges ne s'effectuaient pas. Pour ce faire, Hedin opéra, dans un grand nombre de cas, le dosage de la substance dans le plasma du sang examiné. Connaissant ainsi la quantité absolue du corps en expérience dans le plasma, il pouvait calculer l'abaissement du point de congélation y correspondant et voir, si cette valeur était celle que lui fournissait la détermination directe. Si, oui, la conclusion s'imposait : nul échange ne pouvait s'être opéré entre globules et plasma.

Ayant appliqué la méthode aux sucres (saccharose, glycosé, lactose, galactose, arabinose) il trouva pour $\frac{a}{b}$ des valeurs moyennes allant de 1,46 à 1,53. Or dans les conditions de l'expérience $\frac{a}{b}$ devenait égal à 1,53, pour une substance hypothétique qui serait restée confinée exclusivement dans le plasma. D'où la conclusion que les sucres se comportaient en réalité de la même manière et qu'il fallait concevoir la paroi globulaire comme absolument imperméable pour eux. Il en était de même

pour la mannite (alcool hexatomique) et l'adonite (alcool pentatomique).

L'érythrite donne pour $\frac{a}{b}$ une valeur de 1,49, quand on opère les déterminations immédiatement après le mélange, de 1,20, quand elles sont faites après 24 heures. Pour la glycérine, la valeur de $\frac{a}{b}$ descend rapidement de 1,38 à 1,11, en même temps que le volume des globules rouges, qui s'étaient primitivement rétractés, revient à son volume primitif. Quand $\frac{a}{b} = 1,11$, le volume des globules rouges est le même que s'il n'y avait pas de glycérine dans le sang, malgré le léger excès dans le plasma. Le glycol (alcool biatomique) donne immédiatement à a la valeur de 1,13 et les globules se comportent comme si au lieu d'une solution de glycol, on avait ajouté de l'eau.

Pour l'alcool méthylique $\frac{a}{b} = 1$; pour l'alcool éthylique 0,97. Les autres termes de la série présentent des valeurs approchantes, ce qui indique un partage presque égal entre plasma et globules avec un léger excès dans ces derniers. La valeur de $\frac{a}{b}$ diminue encore pour les aldéhydes des acides gras, pour les cétones, les éthers simples et composés. Pour le chloral, elle est 0,90; pour l'éther sulfurique, elle atteint un minimum de 0,54. Ici nous nous trouvons dans les conditions inverses de celles que présentaient les sucres : les substances se trouvent en grand excès dans les globules.

Pour l'urée $\frac{a}{b} = 1,06$, pour l'uréthane 1,03, l'antipyrine 1,03, l'acétamide 1,1, ce qui indique un partage presque égal entre plasma et globules, comme l'avaient déjà montré les recherches de Gryns et de Schondörff. Les acides aminés tels que le glycocolle, l'alanine, l'asparagine donnent pour $\frac{a}{b}$ les valeurs moyennes 1,40 pour les premiers, 1,30 pour la dernière.

Il en est de même pour les sels de potassium et de sodium, pour lesquels la valeur moyenne de $\frac{a}{b}$ est 1,40. Les sels examinés sont le nitrate et le chlorure des deux métaux. Étant donné que le chiffre indiquant une imperméabilité absolue est 1,53, atteint par les sucres, il y a lieu d'admettre que les sels alcalins, tout en étant localisés presque exclusivement dans le plasma, pénètrent cependant partiellement dans les globules. Il est bon de remarquer ici que pour ces sels, Hedin n'a pas pu constater le moindre échange d'ions électro-négatifs, ce qui indiquerait, en se conformant aux idées de Kœppe, que le sang employé était artériel. D'autre part il est regrettable que Hedin n'ait pas appliqué sa méthode aux carbonates alcalins. Les sels d'ammonium

se sont comportés dans les expériences de Hedin comme le faisaient prévoir les recherches de Gryns. Tandis que pour le chlorure et le bromure $\frac{a}{b}$ se rapproche de l'unité, pour le sulfate, la valeur moyenne trouvée est 1,31.

Dans un travail complémentaire, Hedin étudie par la même méthode d'autres sels d'ammonium et il arrive à la constatation que le phosphate, le tartrate, le succinate se comportent en toute manière comme le sulfate. En ce qui concerne ce dernier, il établit des différences d'action correspondant à des concentrations différentes.

A des dilutions très fortes (0,03 gr-mol par litre) le rapport $\frac{a}{b}$ devient pour $A_{m_2} SO_4$ égal à 0,99, c'est-à-dire qu'à cette concentration le sulfate se comporte comme le chlorure, pour tendre vers des valeurs supérieures avec l'augmentation de la concentration.

A côté du chlorure et du bromure se rangent le nitrate, le sulfocyanate, l'oxalate, le ferrocyanure, le ferricyanure, le lactate, l'éthylsulfate. Pour ces quatre derniers sels, la valeur $\frac{a}{b}$ diminue également mais faiblement avec la concentration, tandis que pour les premiers, dans les limites des observations, la valeur de $\frac{a}{b}$ semble indépendante de la teneur de la solution.

Les sels de triméthylamine et d'éthylamine se comportent comme ceux d'ammoniaque. Le chlorure est pénétrant en toute concentration, le sulfate pénétrant dans des solutions très diluées, de moins en moins pénétrant avec l'augmentation de la concentration.

D'une façon générale, ces résultats confirment, tout en les complétant, les principales conclusions de Gryns.

En ce qui concerne les substances dissociées, ils mettent en évidence la part qui revient aux ions considérés isolément, dans les propriétés d'ensemble des substances. C'est ce que montrent particulièrement les dernières observations ayant trait aux sels d'ammoniaque et des bases azotées. Pour les substances non dissociées, les recherches sur la série des alcools indiquent nettement l'influence du groupe hydroxyle dans les propriétés de la molécule. Mais le résultat général qui se dégage des travaux de Hedin comme de tous les précédents, c'est que dès maintenant, il faut rapporter à des faits d'osmose les propriétés de toutes les substances, si différentes cependant au point de vue chimique, dont l'action a été essayée sur les globules rouges. Tant pénétrantes, que non pénétrantes, ces substances agissent en solutions pures ou en mélanges non en raison de leurs propriétés chimiques, mais suivant des principes tout différents.

C'est ainsi que telle substance, nocive en concentration faible, per-

dra toute nocuité, quand la solution sera suffisamment enrichie, que telle autre ne montrera ni en quantité ni en qualité aucune différence dans ses propriétés nocives, quel que soit l'écart des concentrations employées; toutes choses incompréhensibles pour qui voudrait voir dans ces phénomènes des faits de combinaison ou de décomposition. Si certains détails restent à préciser, l'ensemble est définitivement assis et sous plus d'un rapport la physiologie des globules rouges pourra servir d'exemple à celle d'autres organes. Car les résultats acquis s'étendent bien au delà de la physiologie du sang, les faits sont d'ordre général, d'où leur grand intérêt.

L'étude des conditions de perméabilité de la paroi globulaire, c'est l'étude de l'une des propriétés les plus importantes du protoplasme animal. et, sous ce rapport, il est intéressant de faire remarquer ici qu'il résulte d'observations faites par Overton sur le pouvoir absorbant de la paroi des cellules végétales, que celle-ci se comporte vis-à-vis de la plupart des substances examinées par Gryn's et Hedin comme la paroi des globules rouges. Il n'y aurait de différence que pour les sels ammoniacaux et l'urée, dont le protoplasme végétal ne laisserait passer que peu ou prou. Cependant il est probable que de pareilles ressemblances ne portent que sur les grandes lignes, et que, dans le même organisme, les cellules des divers organes, ayant à accomplir des opérations chimiques différentes, absorbant ou excréant des produits différents, doivent également montrer des différences dans l'électivité de leur paroi vis-à-vis des matières dissoutes dans les milieux liquides.

Pour en revenir aux globules rouges envisagés spécialement au point de vue de leur constitution intime, l'étude qui a été faite de leurs propriétés osmotiques a révélé une analogie complète entre leur façon de se comporter et celle des cellules végétales. On est en droit de conclure de la similitude de propriétés à une similitude de constitution.

D'autre part, cellules végétales et globules se conduisent complètement, dans les nombreuses expériences citées précédemment, comme des vésicules limitées par une paroi semi-perméable, absolument comparable à la membrane de ferro-cyanure de cuivre. L'analogie est absolue, elle rend compte aussi bien des observations faites sur l'action des solutions salines, que de celles portant sur la façon d'agir des poisons globulaires. Bien plus, l'exception apparente que semblaient faire ces derniers aux lois de l'osmose, en est devenue la confirmation la plus éclatante; depuis, les travaux de Gryn's et de Hedin nous ont montré le rapport existant entre la toxicité d'une substance et sa faculté de pénétrer le globule.

Il y a donc lieu de considérer le globule rouge comme constitué essentiellement d'une paroi demi-perméable enfermant un contenu

liquide. Que ce liquide soit placé dans une cavité unique ou dans une multitude de vacuoles, la chose importe peu au point de vue physiologique. C'est affaire aux histologistes de trancher ce point de détail. Le liquide intra-cellulaire contient des substances en solution. Les échanges de ces dernières avec le milieu extérieur sont réglés par leur passage plus ou moins facile à travers la paroi globulaire. Nous savons pour quelques-uns d'entre eux, les sels de potassium, par exemple, que leur passage doit être faible en raison du coefficient d'absorption peu élevé du globule vis-à-vis d'eux.

L'hémoglobine, qui est certes le constituant le plus important du suc cellulaire, est absolument non pénétrante par rapport à la paroi, comme le prouve le fait que toute diffusion de cette substance colorante à l'extérieur est la conséquence d'une altération de l'enveloppe du globule. Bien loin donc de faire admettre une combinaison de l'hémoglobine avec la stroma globulaire, les études précédentes prouvent que l'hémoglobine ne peut même pas l'imprégner pendant la vie de l'hématie; il faut la mort de celle-ci pour que le phénomène se produise.

Anciennement l'opinion prévalait d'une combinaison chimique lâche de l'hémoglobine avec d'autres constituants globulaires. Sans vouloir exposer les nombreuses raisons qui ont été alléguées contre cette manière de voir, il suffira de montrer ici en quelques mots la difficulté, sinon l'impossibilité d'allier une pareille hypothèse avec les faits mis en lumière dans les travaux analysés dans cette revue.

Il faudrait d'abord s'entendre sur la nature de cette combinaison. Est-elle d'ordre purement chimique, ou se range-t-elle parmi les phénomènes de teinture?

On est en droit de rejeter immédiatement la première hypothèse. Car admettre de la part de l'eau distillée un pouvoir dissociant assez grand, pour qu'elle puisse provoquer presque instantanément à la température ordinaire la destruction intégrale du complexe chimique; admettre également que ce pouvoir soit exactement neutralisé par des *équivalents osmotiques* de substances prises au hasard parmi les diverses espèces chimiques, ce serait formuler des suppositions en contradiction avec tout ce que nous apprend la chimie.

La seconde hypothèse ferait du globule une parcelle fibrineuse imprégnée, teinte d'hémoglobine. Celle-ci serait fixée sur la trame globulaire, à la façon d'une matière colorante sur un tissu, par une affinité spéciale, l'affinité mécanique d'Ostwald. Cette conception ne permettrait pas mieux que la précédente de comprendre pourquoi, par exemple, les mêmes concentrations hypotoniques de toutes les substances non pénétrantes permettent la mise en liberté de la matière colorante. Rien dans les faits réels de teinture ne rappelle pareil phé-

nomène. D'ailleurs, si des globules, placés dans l'eau distillée, lui abandonnent leur hémoglobine, il faudrait dans cette hypothèse, que l'adjonction de 1 0/0 de chlorure sodique ait pour conséquence la refixation de l'hémoglobine sur le stroma, puisque dans la solution de 1 0/0 de chlorure sodique, le globule intact retient sa matière colorante.

Les faits sont d'ailleurs tellement démonstratifs qu'il semble superflu de poursuivre cette démonstration.

Il était cependant utile d'insister sur ce point, pour montrer la grande importance que peuvent prendre certaines expériences de physiologie, non pas seulement au point de vue de nos opinions sur le mode d'activité des tissus vivants, mais sur leur structure même, leur constitution anatomique.

La destruction des globules, comme conséquence de phénomènes osmotiques, semble pouvoir être amenée de deux manières : l'eau pure la provoque en déchainant les forces osmotiques intérieures, dont la poussée, libérée de toute entrave, amène rapidement la déchirure de l'enveloppe ; ainsi semblent agir aussi les solutions de certains corps, comme l'urée.

Au contraire, d'autres substances, et le chlorure ammonique en est, seraient plus nocives que l'eau distillée. Il est utile, pour se rendre compte de ces derniers faits, qui, à première vue, semblent constituer des exceptions aux lois strictes de l'osmose, d'envisager d'un peu plus près les rapports des liquides intra et extra-cellulaire avec la paroi du globule. Celle-ci est constituée par une substance ou un mélange de substances, insoluble dans l'eau pure ou dans les solutions salines peu concentrées, mais imbibée de liquide. Or il est certain que le degré et la nature de cette imbibition dépendent de la nature des solutions en contact avec la paroi et de leur concentration.

Quand le globule est en équilibre osmotique avec le liquide extérieur, l'équilibre total résulte de deux équilibres partiels, celui du liquide extérieur avec la paroi, et celui de la paroi avec le suc intra-cellulaire. Introduisons du sucre, une substance totalement non pénétrante, dans le liquide extérieur, l'équilibre total est rompu, mais il se rétablit rapidement par une sortie d'eau pure au travers de l'enveloppe, sans que celle-ci y prenne activement part (tout au plus pourra-t-elle y perdre un peu d'eau d'imbibition). Mais que la substance ajoutée soit pénétrante : cette épithète signifie que la substance imprègne la paroi, *qu'elle est soluble dans celle-ci*. Il se produira un double partage de la substance : d'une part, entre le liquide extérieur et la paroi, d'autre part, entre la paroi et le liquide intérieur. Les choses se passeront comme si l'on ajoutait à un mélange de trois liquides non miscibles, une substance inégalement soluble dans ces trois liquides. Le partage

se fera entre les trois couches liquides suivant les coefficients de solubilité de la substance dans ces trois dissolvants.

Or, dans les expériences de Hedin, nous sommes renseignés sur la distribution entre le liquide extérieur d'une part, et la somme de la paroi plus le liquide intérieur d'autre part.

Mais rien ne nous indique les conditions du partage intra-globulaire entre enveloppe et contenu. Il est probable, bien qu'aucune expérience directe n'ait été faite sur ce sujet, que ce partage sera très différent suivant les cas. Et l'on peut concevoir *a priori* que pour certaines substances pénétrantes, la localisation se fera surtout dans le liquide intra-cellulaire, pour d'autres dans la paroi protoplasmique. Dans ce dernier cas, celle-ci ne sera donc plus imbibée par son liquide ordinaire, mais par une solution de composition tout autre. Quelles seront les conséquences de cet état anormal?

Des expériences de Hofmeister permettent de se faire une idée à ce sujet. Ayant plongé dans diverses solutions salines, de petits disques de gélatine pure, il constata que ces disques s'imprègnent généralement de ces solutions, mais prennent de celles-ci une quantité variable suivant les sels et les concentrations. Pour un même sel, il y a un optimum de concentration, pour lequel la quantité de liquide absorbée par le disque est maxima, et celle-ci dépasse alors notablement la quantité d'eau pure absorbée par un disque témoin, baignant dans l'eau distillée. Ce qui veut dire que *la présence du sel dans la gélatine a augmenté dans des limites très larges sa perméabilité pour l'eau*. Ces faits ne sont que l'expression d'une loi de physique, disant que tout liquide (ou solide) ayant dissous une substance quelconque, possède de nouveaux coefficients de pouvoir dissolvant vis-à-vis d'autres substances.

Il faut donc s'attendre à voir changer ces coefficients dans la paroi d'un globule qui serait imprégnée d'une substance très soluble dans celle-ci. Cette paroi présentera vis-à-vis des deux milieux liquides qu'elle sépare, de nouvelles conditions de pouvoir dissolvant, c'est-à-dire de perméabilité. Et l'on peut concevoir un état tel, que l'imperméabilité absolue de l'hémoglobine soit supprimée, ce qui aura immédiatement pour résultat un partage de cette substance entre liquide intérieur, paroi, liquide extérieur, c'est-à-dire une diffusion de l'hémoglobine dans le milieu ambiant.

De sorte qu'ici encore les seules lois physiques de solution et d'osmose suffisent pour rendre compte de tous les faits.

Dr P. NOLF.

BIBLIOGRAPHIE

1. HAMBURGER. — Ueber den Einfluss chemischer Verbindungen auf Blutkörperchen im Zusammenhang mit ihren Moleculargewichten. — *Archiv für Physiologie* de du Bois-Reymond, 1886.
2. HAMBURGER. — Ueber die durch Salz- und Rohrzucker-Lösungen bewirkten Veränderungen der Blutkörperchen. — *Arch. f. Physiol. de du Bois-Reymond*, 1887.
3. HAMBURGER. — Die Permeabilität der rothen Blutkörperchen im Zusammenhang mit den isotonischen Coëfficienten. — *Zeitschrift für Biologie*, 1890.
4. HAMBURGER. — *Centralblatt für Physiologie*, 1893, p. 161, 656, 758.
5. S. G. HEDIN. — Der Hämatokrit, ein neuer Apparat zur Untersuchung des Blutes, p. 134. — *Untersuchungen mit dem Hämatokrit*, p. 360. — *Skandinavisches Archiv für Physiologie*, 1891.
6. S. G. HEDIN. — Ueber die Einwirkung einiger Wasserlösungen auf das Volumen der rothen Blutkörperchen, p. 207. — Ueber den Einfluss von Salzlösungen auf das Volumen der rothen Blutkörperchen, p. 238. — *Skandinavisches Archiv für Physiologie*, 1895.
7. KOEPPE. — Ueber den Quellungsgrad der rothen Blutscheiben. — *Archiv de du Bois-Reymond*, 1895.
8. GRYNS. — Ueber den Einfluss gelöster Stoffe auf die rothen Blutzellen in Verbindung mit den Erscheinungen der Osmose und Diffusion. — *Pflüger's Archiv für die gesammte Physiologie*, 1896. Bd. 63.
9. KOEPPE. — Der osmotische Druck als Ursache des Stoffaustausches zwischen rothen Blutkörperchen und Salzlösungen. — *Pflüger's Archiv für die gesammte Physiologie*, 1897. Bd 67.
10. HAMBURGER. — Ueber den Einfluss der Athmung auf die Permeabilität der Blutkörperchen. — *Zeitschrift für Biologie*, 1891.
11. HEDIN. — Ueber die Permeabilität der Blutkörperchen. — *Pflüger's Archiv für die gesammte Physiologie*, 1897. Bd 68.
12. HEDIN. — Versuche über das Vermögen der Salze einiger Stickstoffbasen in die Blutkörperchen einzudringen. — *Pflüger's Archiv für die gesammte Physiologie*, 1898. Bd 70.
13. HOFMEISTER. — Zur Lehre von der Wirkung der Salze. — *Archiv für experiment. Pathologie und Pharmacologie*. Bd 28.



